

Autor:

ROSA ANA PEREZ MARTIN

PREPARACION Y ESTUDIO DE NUEVOS INHIBIDORES DE  
CATECOL-O-METILTRANSFERASA DE INTERES TERAPEUTICO POTENCIAL

x53.22 4228-0

Directores:

ELDIBERTO FERNANDEZ ALVAREZ

Profesor de investigación del C.S.I.C.

OFELIA NIETO LOPEZ

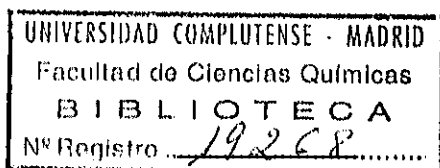
Investigador científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica

Año 1993



INSTITUTO DE QUIMICA ORGANICA GENERAL DEL C.S.I.C.



5307722916

547(04)  
PLR

**PREPARACION Y ESTUDIO DE NUEVOS INHIBIDORES DE  
CATECOL-O-METILTRANSFERASA DE INTERES  
TERAPEUTICO POTENCIAL**

**MEMORIA**

**que para optar al grado de doctor presenta:**

**Rosa Ana PEREZ MARTIN**

**Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica  
Biológica, del Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C., bajo  
la Dirección del Dr. Eldiberto FERNANDEZ ALVAREZ, Profesor de  
Investigación del CSIC, y de la Dra. Ofelia NIETO LOPEZ,  
Investigador Científico del C.S.I.C.**

A mis padres

A Jose

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante los últimos años han sido numerosas las personas que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta Tesis, a todas ellas quiero darles las gracias por su apoyo y su ayuda.

Desde esta página quiero agradecer a mis directores, Dr. Eldiberto Fernández Alvarez y Dra. Ofelia Nieto las aportaciones, interés y dedicación a este trabajo, así como la oportunidad que me brindaron de llevarlo a cabo.

Asimismo, deseo expresar un agradecimiento muy especial a Javier Piedrafito por su continua ayuda, sus ánimos y sobre todo por su amistad. ¡Muchas gracias!.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio y ahora amigos, Carmen, Conchi, Pilar, Loli, M<sup>a</sup> Angeles, Angela, Antonio, Feli y Marfa, el haberme soportado y ayudado, así como los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Gracias a todos aquellos a los que el no estar trabajando directamente conmigo no les ha librado de aguantarme: Roberto, Manolo, Javier, Jose Luis, Alfonso, Rosa, Guille, Paloma, Coti, Amparo, Diego, Enrique, Ana y Ricardo.

Además, quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador para la realización de éste trabajo.

## INDICE

### ABREVIATURAS

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	4
1. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT): CARACTERISTICAS GENERALES	5
1.1. Formas de COMT: COMT-S y COMT-M	6
1.2. Aislamiento y determinación de la actividad enzimática	7
2. CARACTERISTICAS DE LA REACCION CATALIZADA POR COMT	9
2.1. Sustratos	10
2.2. Mecanismo cinético	11
3. INHIBICION DE COMT	13
3.1. Interés terapéutico	14
3.2. Inhibidores de COMT	18
3.2.1. Pirogalol y derivados	18
3.2.2. Catecol y derivados	19
3.2.3. Otras estructuras	22
3.2.4. Inhibidores irreversibles	24

<b>OBJETIVOS</b>	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	30
1. SINTESIS DE NITRODERIVADOS DE HIDROXIMETOXI Y DIHIDROXIBENZALDEHIDO	31
1.1. Síntesis de nitroderivados de hidroximetoxibenzaldehído	35
1.1.1. Nitroderivados de vainillina	35
1.1.2. Nitroderivados de isovainillina	36
1.1.3. Nitroderivados de <i>o</i> -vainillina	37
1.2. Síntesis de nitroderivados de dihidroxibenzaldehído	38
1.2.1. Nitroderivados de 3,4-dihidroxibenzaldehído	38
1.2.2. Nitroderivados de 2,3-dihidroxibenzaldehído	41
2. ESTUDIOS DE INHIBICION DE COMT POR HIDROXIMETOXI Y DIHIDROXINITROBENZALDEHIDOS	43
2.1. Cálculo de IC <sub>50</sub>	45
2.2. Estudios cinéticos de la inhibición de COMT	49
2.2.1. Inhibición reversible	49
2.2.2. Inhibición reversible de COMT por nitroderivados de hidroximetoxi y dihidroxibenzaldehído	52
3. SINTESIS DE 1-VINILDERIVADOS DE NITROGUAYACOL Y NITROCATECOL	56
4. INHIBICION DE COMT POR 1-VINILDERIVADOS DE NITROGUAYACOL Y NITROCATECOL	64
4.1. Inhibición de COMT por (3-hidroxi-4-metoxi-5-nitro benciliden)-2,4-pentanodiona (17)	69

4.1.1. Inhibición irreversible	69
4.1.2. Cinética de la inhibición irreversible de COMT por <b>17</b>	71
4.1.3. Reacción del compuesto <b>17</b> con DTT e inhibición reversible de COMT por el complejo DTT- <b>17</b>	75
4.1.4. Estudios de protección por sustratos	76
4.2. Inhibición de COMT por [2-(3,4-dihidroxi-2-nitrofenil)vinil]- fenil cetona ( <b>21</b> )	80
4.2.1. Inhibición enzimática de tipo "tight-binding"	80
4.2.2. Cinética de la inhibición "tight-binding" de COMT por <b>21</b>	81
5. SINTESIS DE DERIVADOS DE 4-(3,4-DIHIIDROXIFENIL)BUT -1-ENO	88
6. INHIBICION DE COMT POR [3-(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL) PROPILIDEN]-2,4-PENTANODIONA ( <b>39</b> )	95
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	98
<b>PREPARACION Y CARACTERIZACION DE PRODUCTOS</b>	99
- TECNICAS GENERALES	100
1. NITRODERIVADOS DE VAINILLINA	101
1.1. Síntesis de 2-nitrovainillina ( <b>1</b> )	101
1.2. Síntesis de 6-nitrovainillina ( <b>3</b> )	102
2. NITRODERIVADOS DE ISOVAINILLINA	104
2.1. Síntesis de 2-nitro y 6-nitroisovainillina ( <b>4 y 6</b> )	104
2.2. Síntesis de 2,6-dinitroisovainillina ( <b>16</b> )	105
2.3. Síntesis de 5-nitroisovainillina ( <b>5</b> )	106

3. NITRODERIVADOS DE <i>o</i> -VAINILLINA	107
3.1. Síntesis de 5-nitro- <i>o</i> -vainillina (8)	107
3.2. Síntesis de 6-nitro- <i>o</i> -vainillina (9)	108
3.3. Síntesis de 4-nitro- <i>o</i> -vainillina (7)	109
4. NITRODERIVADOS DE 3,4-DIHIDROXIBENZALDEHIDO	111
4.1. Síntesis de 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído (10)	111
4.2. Síntesis de 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (11)	112
4.3. Síntesis de 3,4-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (12)	112
5. NITRODERIVADOS DE 2,3-DIHIDROXIBENZALDEHIDO	113
5.1. Síntesis de 2,3-dihidroxi-4-nitrobenzaldehído (13)	113
5.2. Síntesis de 2,3-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (14)	113
5.3. Síntesis de 2,3-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (15)	114
6. 1-VINIL DERIVADOS DE NITROGUAYACOL Y NITROCATECOL	115
6.1. Síntesis de (3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)-2,4-pentanodiona (17)	115
6.2. Síntesis de [2-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (18)	115
6.3. Síntesis del ácido (3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)nitroacético (19)	116
6.4. Síntesis de 2,5-bis(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)ciclopentanona (20)	117
6.5. Síntesis de 5-nitro-3-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrofenil)-2-oxo glutarato de etilo (26)	117
6.6. Síntesis de 2-(3,4-dihidroxi-2-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (21)	118
6.7. Síntesis del ácido (3,4-dihidroxi-2-nitrobenciliden)nitroacético (22)	119



6.8. Síntesis de 2,5-bis(3,4-dihidroxi-2-nitrobenciliden) ciclopentanona (23)	119
6.9. Síntesis del ácido (2,3-dihidroxi-4-nitrobenciliden)nitroacético (24)	120
6.10. Síntesis de (3,4-dihidroxi-5-nitrobenciliden)-2,4- pentanodiona (25)	120
<b>7. DERIVADOS DE 4-(3,4-DIHIDROXIFENIL)BUT-1-ENO</b>	<b>121</b>
7.1. Síntesis del ácido 3-(3',4'-metilendioxfenil)propiónico (28)	121
7.2. Síntesis de 3-(3',4'-metilendioxfenil)propanoato de metilo (29)	121
7.3. Síntesis de 3-(3',4'-metilendioxfenil)propanal (30)	122
7.4. Síntesis de 3-(3',4'-metilendioxi-6-nitrofenil)propanal (32)	122
7.5. Síntesis del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propiónico (35)	123
7.6. Síntesis de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propanal (36)	123
7.7. Síntesis de 3-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)propanal (38)	124
7.8. Síntesis de [3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propiliden]-2,4- pentanodiona (39)	125
<b>ENSAYOS BIOLOGICOS</b>	<b>126</b>
- MATERIALES Y METODOS	127
1. PREPARACION DE COMT	127
2. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS	128
3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA	129
4. ESTUDIOS CINETICOS DE INHIBICION DE COMT	129

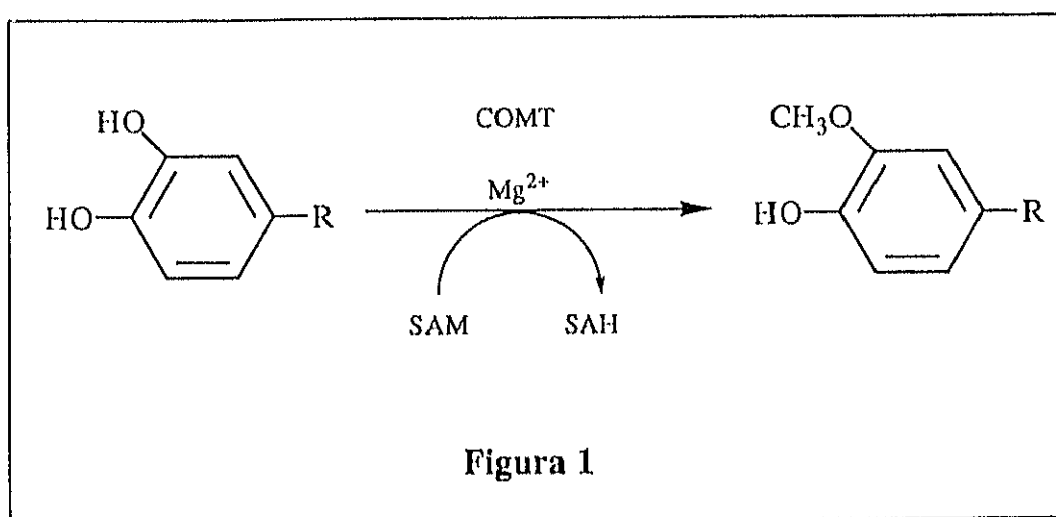
4.1. Determinación de los valores de IC <sub>50</sub>	130
4.2. Estudios de inhibición de COMT	130
5. ANALISIS DE LOS RESULTADOS CINETICOS	132
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFIA	136

## ABREVIATURAS

Catecol	1,2-Dihidroxibenzol
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
COMT-M	Catecol-O-metiltransferasa unida a membrana
COMT-S	Catecol-O-metiltransferasa soluble
DIBAL	Hidruro de diisobutilaluminio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNC	1,5-Dinitrocatecol
DTT	Ditiotreitol
Guayacol	2-Metoxifenol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibidor a la cual se inhibe la actividad enzimática en un 50%
Isovainillina	3-Hidroxi-4-metoxibenzaldehído
I <sub>t</sub>	Concentración total de inhibidor
K <sub>app</sub>	Constante de inhibición aparente
K <sub>I</sub>	Constante de inhibición
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis. Concentración de sustrato para la cual la velocidad es la mitad de V <sub>max</sub>
L-Dopa	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
MAO	Monoaminoxidasa
Nitecapone	3-(3,4-dihidroxi-5-benciliden)-2,4-pentanodiona
3-OMD	3-O-Metildopa
o-Vainillina	2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído
PDC	Dicromato de piridinio
SAH	S-Adenosil homocisteina
SAM	S-Adenosil metionina
"tight-binding"	Inhibidor reversible lentamente dissociable
Vainillina	4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima que se alcanza a saturación de sustrato

## ***INTRODUCCION***

La catecol-O-metiltransferasa (COMT, EC. 2.1.1.6.) es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) a sustratos que poseen un grupo catecol, dando lugar al producto de O-metilación y una cantidad estequiométrica de S-adenosil homocistefna (SAH)<sup>1-3</sup>. La reacción tiene lugar en presencia de un catión divalente, siendo el ion  $Mg^{+2}$  el más efectivo<sup>4</sup>. El esquema del proceso se indica en la figura 1.



Aunque en 1951 se observó por primera vez la existencia de procesos de O-metilación en tejidos animales<sup>5</sup>, esta enzima no fue descrita y parcialmente purificada hasta 1958<sup>1</sup>. Ese mismo año, Axelrod y cols.<sup>6</sup> mostraron que esta enzima cataliza *in vivo* la O-metilación de catecolaminas tales como dopamina y adrenalina.

Los estudios realizados a partir de entonces ponen de manifiesto que COMT juega un papel fisiológico importante en la inactivación extraneuronal de catecolaminas endógenas y en la detoxificación de catecoles xenobióticos<sup>3,7,8</sup>. La alteración de los niveles normales de catecolaminas fisiológicamente activas se ha relacionado con diversos estados patológicos tales

como la hipertensión, la depresión endógena y la enfermedad de Parkinson<sup>7</sup>; esto hace que exista un gran interés en la obtención de inhibidores efectivos y selectivos de COMT que puedan ser utilizados con fines terapéuticos, solos o en combinación con otros productos, en el tratamiento de algunas enfermedades originadas por deficiencias en determinadas catecolaminas.

Asimismo, el control de la actividad de COMT mediante el uso de compuestos capaces de inhibir específica y potentemente la enzima podría ser de gran utilidad en la caracterización estructural y funcional de ésta, así como en la elucidación de su papel fisiológico.

Aunque se han descrito como inhibidores de COMT un considerable número de productos, la mayoría de éstos carecen de eficacia y selectividad, además de ser altamente tóxicos<sup>7</sup>. Recientemente se han preparado nuevos inhibidores de COMT potentes y selectivos<sup>9-11</sup>, algunos de los cuales están siendo experimentados en animales y en voluntarios humanos para su aplicación en el tratamiento del Parkinson<sup>12-15</sup>. La mayor parte de estos productos son derivados de 3,4-dihidroxibenceno sustituido en posiciones 1 y 5, siendo el sustituyente en posición 5 un grupo nitro.

El desarrollo de la Tesis que se describe en esta Memoria se llevó a cabo teniendo en cuenta los antecedentes existentes hasta el momento sobre inhibidores de COMT, así como los resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo con derivados de maleimida<sup>16,17</sup>.

## ***ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS***

**1. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT).  
CARACTERISTICAS GENERALES**



La catecol-O-metiltransferasa es una enzima ampliamente distribuida en los seres vivos, tanto en animales<sup>1</sup> como en plantas<sup>18</sup>. En mamíferos esta enzima está presente en la mayor parte de los tejidos, así como en el sistema nervioso periférico y central, observándose mayores actividades en hígado, riñón, intestino, útero y placenta<sup>7</sup>. La principal función de COMT es el metabolismo de catecoles con actividad biológica o tóxicos.

COMT es una enzima citoplásmica de la que existen dos formas diferenciadas en base a su localización subcelular, la forma soluble (COMT-S) y la forma asociada a membrana (COMT-M), que se han puesto de manifiesto en cerebro<sup>19,20</sup>, corazón<sup>20</sup>, hígado<sup>21</sup>, intestino<sup>22</sup> y eritrocitos<sup>23</sup>, aunque las características exactas de cada una de estas formas no han sido establecidas hasta el momento. Además, se han detectado diferentes fracciones solubles con actividad que hace pensar en la posible existencia de isoenzimas<sup>23</sup> o al menos, de diferentes estados funcionales de la enzima.

### 1.1. FORMAS DE COMT: COMT-S y COMT-M

Inicialmente se pensó que COMT se encontraba localizada casi exclusivamente en la fracción soluble de la célula<sup>1</sup>, pero posteriormente se observó que microsomas de hígado de rata, una vez separados de la fracción soluble, también eran capaces de metilar catecoles<sup>24</sup>, poniendo así de manifiesto la existencia de enzima unida a membrana.

Los estudios realizados con COMT parecían mostrar que la mayor parte de la actividad de la enzima, tanto en tejidos humanos como en rata, se debía a la fracción soluble<sup>25-27</sup> (la actividad de COMT-M se suponía comprendida entre un 0 y un 30% del total). Así, la mayoría de las revisiones publicadas sobre esta enzima consideraban que en el sistema nervioso central la forma soluble era la que llevaba a cabo predominantemente la O-metilación de catecolaminas<sup>7,8</sup>; no obstante, una reciente revisión sobre COMT unida a membrana y su papel en la O-metilación de catecolaminas neurotransmisoras<sup>28</sup> considera que, en contra de lo que se creía hasta entonces, es la COMT-M la principal responsable de la metilación de catecolaminas a

concentraciones bajas o fisiológicamente normales de éstas, siendo la actividad de la fracción soluble la que predomina una vez que ha tenido lugar la saturación de la forma unida a membrana.

A pesar de que ambas formas parecen tener una considerable similitud estructural, existen diferencias tanto en la estructura física como en las propiedades bioquímicas de las mismas. Así, se ha establecido que COMT-M es una proteína integral de membrana que presenta una afinidad hacia sustratos catecólicos mucho mayor que COMT-S<sup>29</sup>; ambas formas difieren entre otras cosas en el peso molecular (aproximadamente 26 KDa para COMT-M y 23 KDa para COMT-S), el pI (6,2 para COMT-M mientras que el de COMT-S es 5,2) y la localización subcelular<sup>28</sup>.

A su vez existen distintas formas de COMT-S que fueron observadas por primera vez por electroforesis, durante la purificación de la enzima aislada de hígado de rata<sup>30</sup>. En 1985 Grossman y cols.<sup>27</sup> aislaron de hígado de rata dos formas enzimáticas con peso molecular 23 y 26 KDa; la forma de 23 KDa pudo separarse en tres bandas con distinto pI.

Resultados recientes parecen mostrar que las distintas formas de COMT se originaron a partir de un único gen y diversas modificaciones post-traduccionales<sup>26,31</sup>. La expresión de COMT-S y COMT-M recombinante en *Escherichia coli*<sup>32</sup> y en células eucarióticas<sup>33</sup> parecen indicar que la forma soluble de COMT se genera a partir de la COMT-M tras una modificación traduccional.

## 1.2. AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La primera vez que se realizó el aislamiento de la enzima se utilizó hígado de rata como fuente de COMT y se obtuvo una purificación de 30 veces respecto del homogeneizado de partida<sup>1</sup>. Posteriormente, se obtuvo un grado de purificación de 200 veces<sup>34</sup> mediante fraccionamiento con sulfato amónico, filtración en gel y posterior cromatografía de intercambio iónico; la introducción de un nuevo paso de purificación en este proceso<sup>35</sup> permitió un grado de purificación de unas 450 veces y se determinó un peso molecular de 24.000 Da. Se observó también que la enzima aislada presentaba una gran inestabilidad que se reducía incluyendo ditiotreitól (DTT) en la preparación; esta inestabilidad se hizo más patente al aumentar el grado de pureza de la preparación enzimática<sup>36</sup>. Utilizando cromatografía de afinidad, después de los

procesos de filtración, se ha llegado a purificar la enzima de hígado de cerdo unas 3.200 veces<sup>37</sup> y la de cerebro de cerdo unas 16.500<sup>38</sup>.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer una o ambas formas de la enzima ha ayudado al reconocimiento y posterior secuenciación de COMT aislada de hígado de rata<sup>26</sup>; y más recientemente de placenta humana<sup>39</sup> y de hígado de cerdo<sup>40</sup>.

La actividad de las preparaciones enzimáticas puede ser detectada empleando distintas técnicas analíticas<sup>41</sup>: métodos fluorimétricos, espectrofotométricos, isotópicos, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

El primer método utilizado para la determinación de la actividad de COMT fue la medida de la fluorescencia de los productos O-metilados a pH bajo<sup>1</sup>; no obstante, para la determinación de los productos de metilación mediante este procedimiento es necesario separar las catecolaminas de partida, ya que éstas tienen la misma excitación y emisión que los productos O-metilados. Para evitar este problema, posteriormente el método más empleado ha sido el radioquímico, en el cual se utiliza SAM marcada con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$  y se mide la radiactividad, tras extraer de la mezcla de reacción el producto resultante de la O-metilación del sustrato. Este método posee una gran sensibilidad y precisión<sup>42</sup>.

Los avances que han experimentado las técnicas analíticas han potenciado el empleo del HPLC en el proceso de separación de los productos, utilizando para su posterior detección alguno de los métodos indicados anteriormente<sup>43-45</sup>.

## **2. CARACTERISTICAS DE LA REACCION CATALIZADA POR COMT**

## 2.1. Sustratos

COMT puede actuar sobre una amplia variedad de sustratos aceptores de grupos metilo, todos ellos con una característica común: la presencia de una estructura catecol, independientemente de cualquier otra sustitución en el anillo aromático. Sin embargo, el único sustrato que puede actuar como donador de metilos en este proceso es el estereoisómero natural (-)SAM<sup>46</sup>.

Aunque en un principio se observó que la enzima no mostraba estereoespecificidad respecto a D- y L- isómeros de adrenalina<sup>1</sup> y noradrenalina<sup>47</sup>, posteriormente el estudio de la estereoespecificidad y selectividad de COMT para dopa y derivados mostró que la enzima presenta una mayor afinidad y mayor velocidad máxima con el isómero L-dopa<sup>48</sup>.

La O-metilación de catecolaminas y otros sustratos fisiológicos *in vivo* conduce casi exclusivamente al derivado metilado en posición *meta*<sup>4</sup>; no obstante, la enzima es capaz de metilar *in vitro* la posición *para* de los mismos sustratos fisiológicos<sup>49,50</sup>. Esta diferencia puede deberse a alguna alteración en la naturaleza del centro activo de la enzima que podría tener lugar durante el proceso de aislamiento, o bien a que *in vivo* los productos *p*-metilados puedan ser metabolizados por otras rutas alternativas.

La proporción de productos *p*- y *m*-O-metilados *in vitro* depende fundamentalmente de tres factores: la concentración del catión divalente, la naturaleza del sustrato aromático y el pH de la mezcla de reacción. Así, los isómeros metilados en posición *meta* predominan con sustratos que contienen sustituyentes fuertemente polares, como ocurre en la mayoría de los sustratos fisiológicos<sup>49</sup>. Con sustituyentes no polares la relación entre productos *m*- y *p*-metilados es próxima a la unidad<sup>51</sup>.

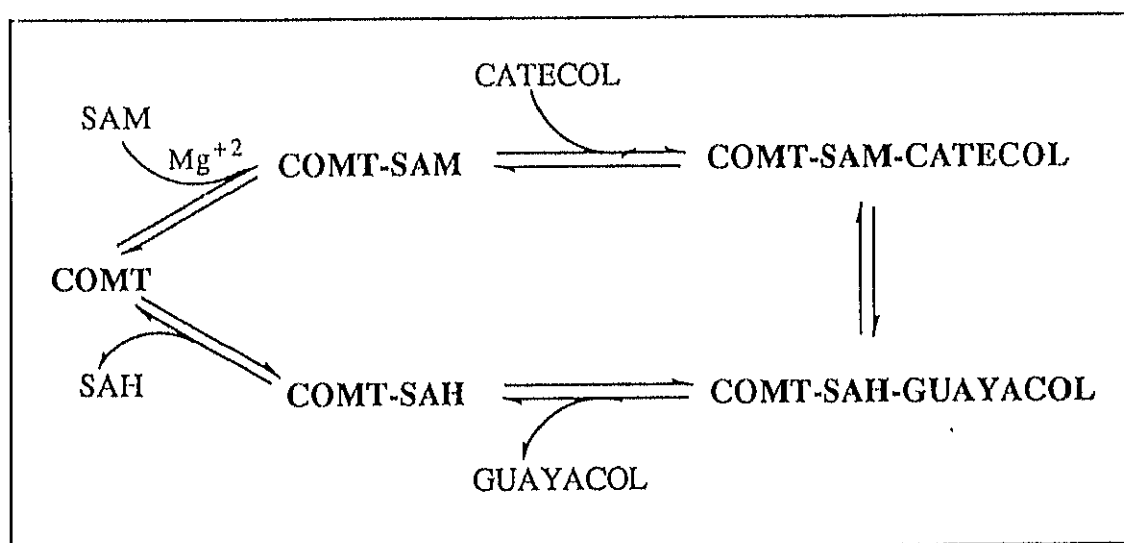
## 2.2. Mecanismo cinético

Aunque los estudios dirigidos a esclarecer el mecanismo cinético de la reacción catalizada por COMT han dado lugar a resultados contradictorios, finalmente parece establecido un mecanismo secuencial para este proceso.

El primer mecanismo propuesto para esta reacción fue un mecanismo al azar, utilizando en el estudio enzima purificada de hígado de rata y adrenalina como sustrato<sup>52,53</sup>. También fue propuesto para el proceso un mecanismo ping-pong basándose en estudios de inhibición por tropolona<sup>54</sup> y 8-hidroxiquinolina<sup>55</sup>.

Posteriormente, Rivett y Roth<sup>56</sup> postularon en 1982 un mecanismo secuencial tras realizar estudios de velocidades iniciales, inhibición por producto y por tropolona, con enzima unida a membrana aislada de cerebro humano. Este tipo de mecanismo fue también propuesto cuando se realizó su estudio con enzima soluble de cerebro de rata<sup>57</sup>, de cerebro humano<sup>58</sup> y de hígado de cerdo<sup>17</sup>. Estos últimos estudios permitieron descartar los mecanismos al azar y ping-pong originalmente descritos para COMT.

En el esquema propuesto para el mecanismo de la reacción de COMT, el primer sustrato que se une a la enzima es el donador de metilos, siendo el guayacol el primer producto que se libera.



Un estudio sobre el mecanismo cinético de unión del  $Mg^{2+}$  realizado por Jeffery y Roth<sup>59</sup> (1987) sugería que el catión divalente se une a COMT siguiendo un mecanismo de reacción secuencial en equilibrio rápido, previo a la unión de SAM. No obstante, en nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio de protección por sustratos de la inactivación de COMT por derivados de maleimida, observándose que no parecía necesaria la presencia de iones magnesio para la unión de SAM; por tanto estos resultados sugerían una unión al azar de SAM y  $Mg^{+2}$  17.

### **3. INHIBICION DE COMT**



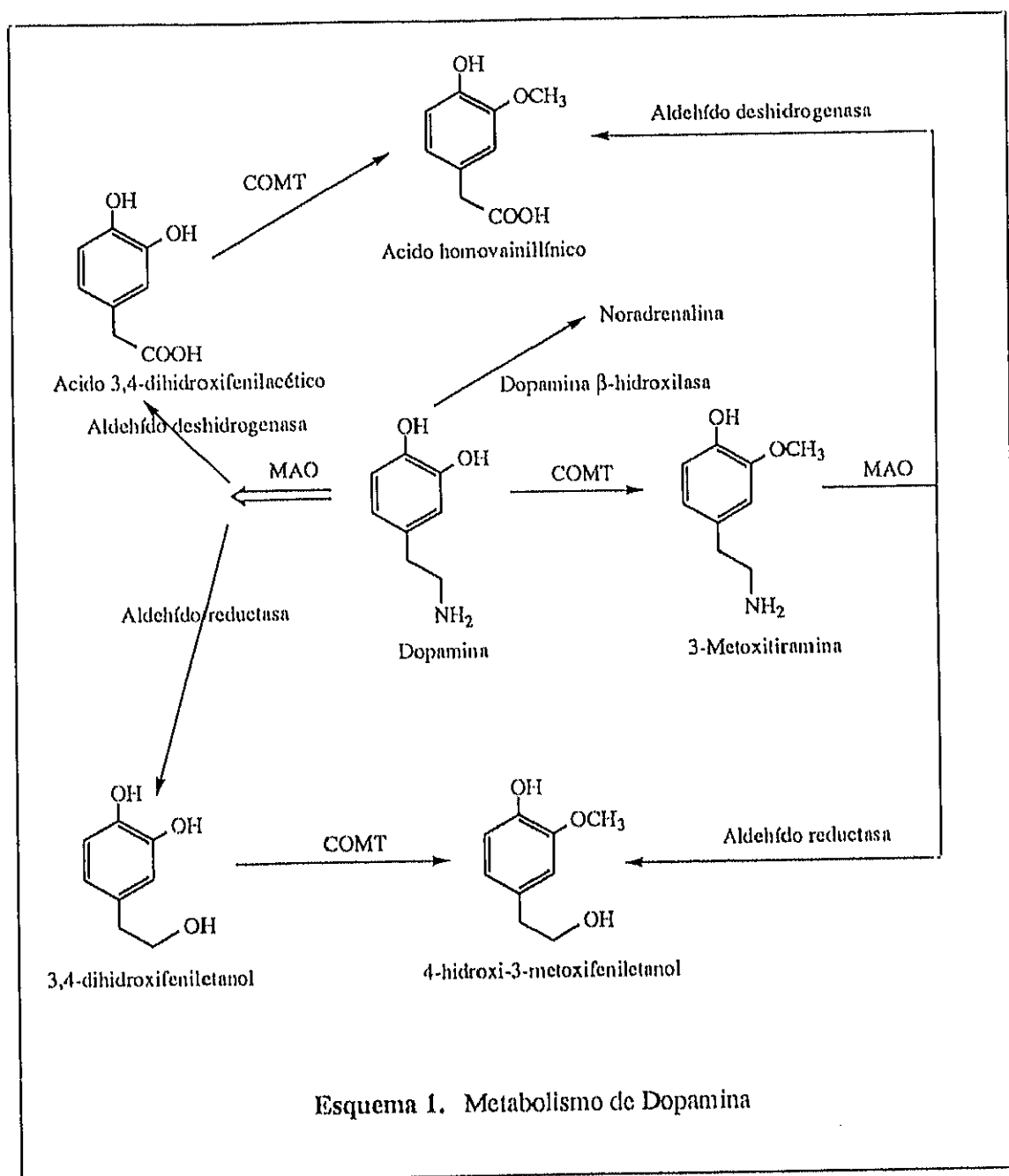
### 3.1. Interés terapéutico.

Como ya se ha indicado en la introducción, COMT juega un importante papel fisiológico en la inactivación de catecolaminas endógenas y en la detoxificación de catecoles xenobióticos. La mayoría de los productos metabólicos de dopamina, norepinefrina y epinefrina excretados en la orina son el resultado de procesos de desaminación y metilación.

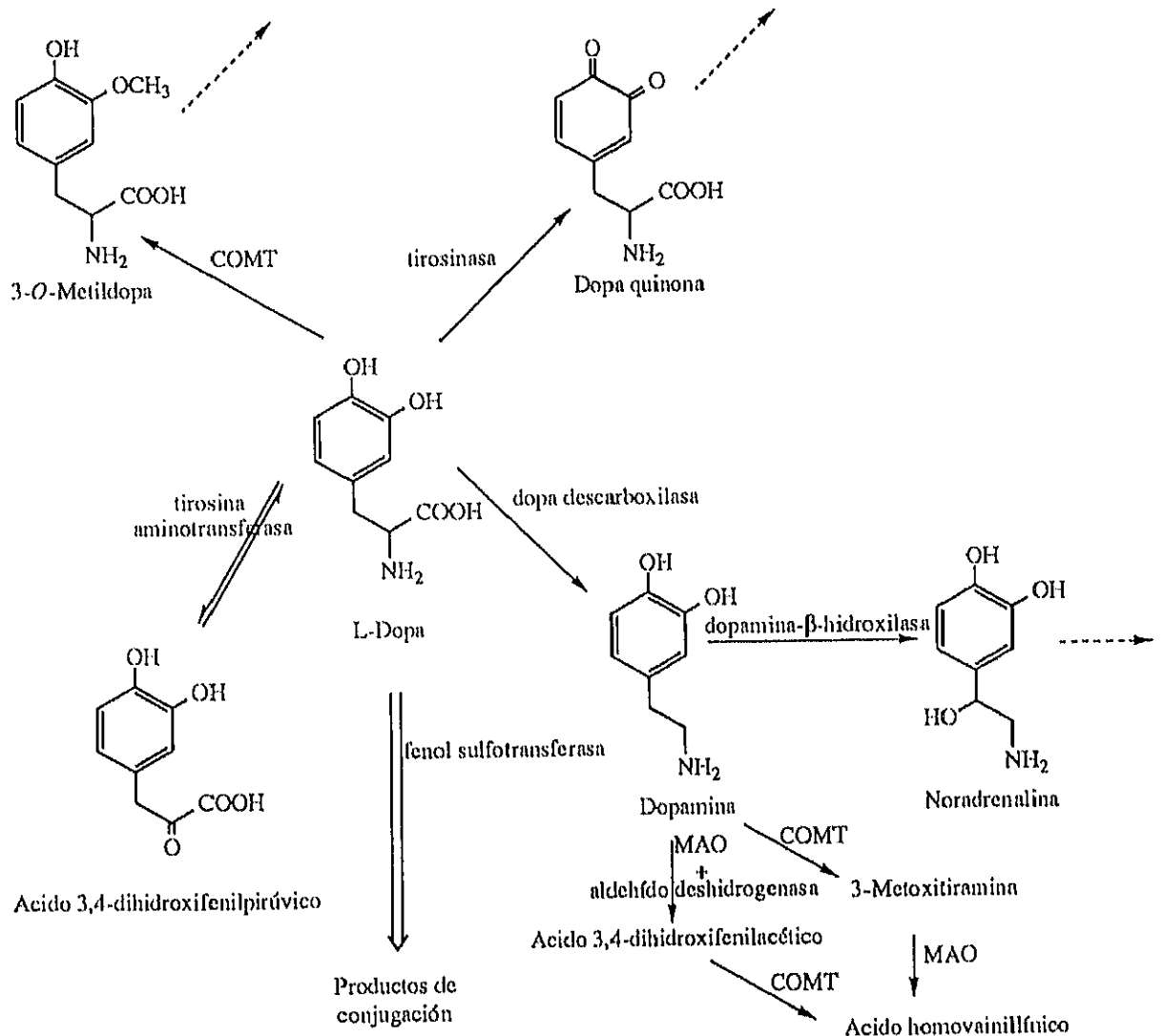
Existe un gran interés en la obtención de inhibidores selectivos de COMT de baja toxicidad, debido a que algunas catecolaminas sobre las que actúa la enzima se encuentran implicadas en varias situaciones clínicas, tales como la hipertensión, el Parkinson y la depresión endógena entre otras<sup>7</sup>.

Desde el punto de vista terapéutico, el aspecto más interesante de la búsqueda de nuevos inhibidores de COMT es su aplicación potencial en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson<sup>23,60-62</sup>. Esta enfermedad se caracteriza por rigidez muscular, espasmos, temblores y pérdida de habilidad para los movimientos iniciales, como resultado de una deficiencia en dopamina causada por la destrucción gradual de las neuronas dopaminérgicas en el striatum<sup>63</sup>.

La dopamina como tal no puede ser administrada en el tratamiento de esta enfermedad, debido a su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica; por ello, para mitigar los síntomas del Parkinson<sup>64</sup> se utiliza un precursor de dopamina, la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa o levodopa), la cual es capaz de llegar al cerebro, donde es transformada enzimáticamente a dopamina. En los esquemas 1 y 2 se muestran las principales rutas del metabolismo de dopamina y levodopa respectivamente.



No obstante, de la levodopa administrada oralmente solo una pequeña parte es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, pues una parte importante es rápidamente descarboxilada en los vasos sanguíneos periféricos dando lugar a dopamina<sup>65</sup>. La introducción de un inhibidor selectivo de dopadescarboxilasa periférica (carbidopa o benserazide) permite aumentar la proporción de levodopa en sangre, aunque el porcentaje de ésta sigue siendo muy bajo ya que únicamente llega al cerebro entre 5-10% de la administrada oralmente<sup>61</sup>.

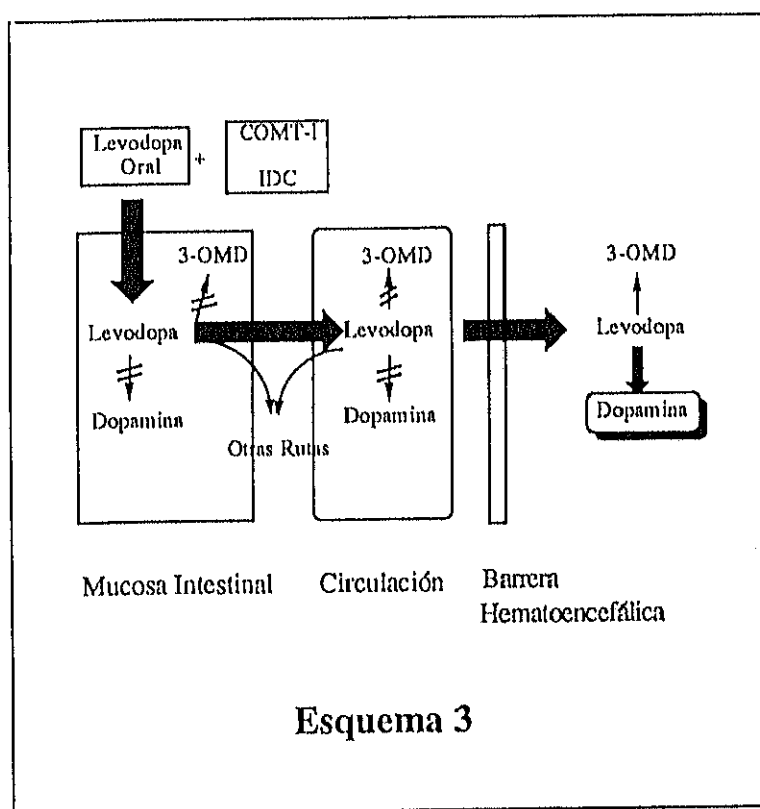


Esquema 2. Principales rutas metabólicas de L-Dopa

Cuando la dopadescarboxilasa es inhibida, tiene lugar una activación de otra ruta metabólica de levodopa, la O-metilación<sup>66,67</sup>, dando lugar a un aumento de los niveles de 3-O-metildopa (3-OMD), que no sólo resulta inactivo en la mejora de los síntomas del

Parkinson<sup>68,69</sup>, sino que también compite con el transporte activo de levodopa hacia la mucosa intestinal y la barrera cerebral<sup>70</sup>. Otra posible ruta metabólica que intensifica su actividad es la de conjugación, mayoritariamente sulfoconjugación, aunque los datos cuantitativos para esta ruta se desconocen hasta el momento. La producción de 3-OMD catalizada por COMT es la segunda ruta metabólica en orden de importancia (10%) del metabolismo de L-dopa<sup>71,72</sup>. Una concentración excesiva de dopamina en el tracto circulatorio produce diversos efectos secundarios tales como náuseas, vómitos, arritmias cardíacas, hipotensión, etc<sup>73</sup>.

Según lo expuesto, cabe esperar que la utilización de un inhibidor de COMT en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson pueda contrarrestar estos efectos negativos. En el esquema 3 se indican de forma general la absorción, principales rutas metabólicas y penetración en el cerebro de levodopa, cuando se administra éste junto con un inhibidor de descarboxilasa (IDC) y un inhibidor de COMT (COMT-I).



### 3.2 Inhibidores de COMT

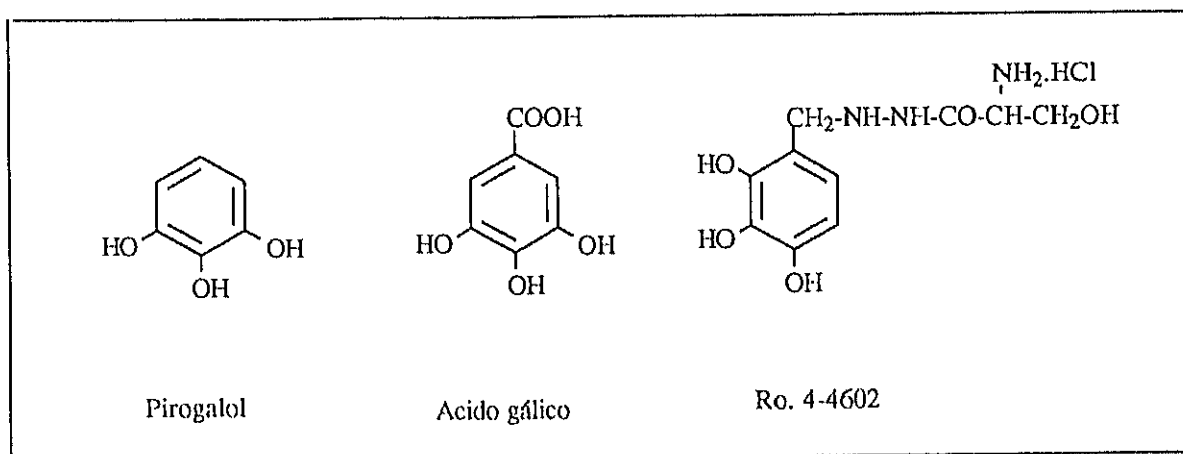
Aunque los intentos llevados a cabo hasta el momento dirigidos a la obtención de un inhibidor específico de COMT han sido numerosos, la mayoría de los productos descritos son inefectivos, tóxicos o poco selectivos<sup>7a</sup>. La mayoría de los compuestos sintetizados y ensayados como inhibidores de COMT tienen una estructura base análoga a la de los sustratos que intervienen en el proceso o a la de los productos que se forman, aunque existe también un reducido número de productos que actúan como inhibidores de la enzima y su estructura no presenta esta analogía.

Recientemente han sido descritos algunos compuestos que actúan como inhibidores de COMT potentes y selectivos<sup>9,10</sup>, algunos de los cuales presentan unas características farmacológicas que les hacen interesantes para uso clínico<sup>7b</sup>. Estos productos tienen como estructura base un anillo de catecol sustituido en posición 5 por un grupo nitro y en posición 1 por distintos sustituyentes que, en su mayor parte, presentan conjugación con el anillo aromático.

#### 3.2.1. Pirogalol y derivados.

El pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno) fue descrito en 1959 como inhibidor de COMT<sup>74,75</sup>, pero no se consideró apto para su uso clínico dada su elevada toxicidad y baja potencia *in vivo*. Este producto se comporta como un excelente sustrato de la enzima<sup>7</sup> y su metilación da lugar a 1,3-dihidroxi-2-metoxibenceno<sup>76</sup>. Los efectos inhibidores de este producto *in vivo* son de muy corta duración<sup>1</sup>.

Algunos análogos estructurales de interés son el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) y la N<sup>1</sup>-(DL-seril)-N<sup>2</sup>-(2,3,4-trihidroxibencil)hidrazina (Ro. 4-4602). El primero de estos compuestos actúa como inhibidor de COMT menos potente que el pirogalol, pero mucho menos tóxico. El producto Ro. 4-4602 es un inhibidor de L-dopa descarboxilasa que actúa asimismo como inhibidor de COMT, con un valor de IC<sub>50</sub> aparentemente cercano al del pirogalol<sup>77</sup>.

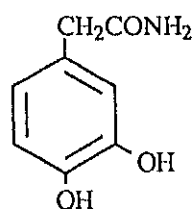


### 3.2.2. Catecol y derivados.

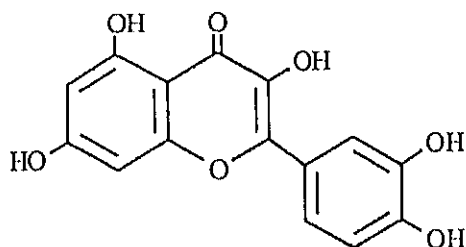
El catecol es un sustrato de COMT<sup>78</sup> que actúa *in vivo* como inhibidor competitivo<sup>79</sup>; sin embargo, este producto posee una elevada toxicidad y efectos convulsivos<sup>80</sup> que hacen inviable su utilización clínica.

Existe un gran número de compuestos derivados de catecol que actúan como inhibidores de COMT, como por ejemplo:

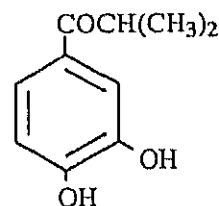
- 2-(3,4-Dihidroxifenil)acetamida (dopacetamida) y derivados, especialmente la  $\alpha$ -propil dopacetamida. Estos productos presentan una potencia como inhibidores de COMT similar a la del pirogalol y no son tóxicos *in vivo*<sup>79</sup>, no obstante, se conocen pocos datos sobre la inhibición producida por estos productos.
- Algunos flavonoides<sup>81</sup>, como por ejemplo la quercetina y la rutina.
- La 3,4-dihidroxi- $\alpha$ -metilpropiofenona (U-0521) y cetonas análogas<sup>82</sup>. U-0521 es un producto que presenta gran afinidad hacia COMT y actúa como un potente inhibidor de la enzima *in vivo*, prolongando notablemente el efecto de L-dopa y dopamina en el tratamiento del Parkinson<sup>83,84</sup>.
- Productos utilizados como fármacos tales como la L-dopa<sup>85</sup>, el ácido 3-( $\alpha$ -hidrazino- $\alpha$ -metil-3,4-dihidroxifenil) propiónico<sup>77</sup> ( $\alpha$ -hidrazino- $\alpha$ -metil-L-dopa, carbidopa), la isoprenalina<sup>86</sup>, etc.



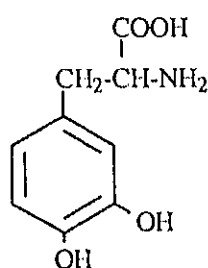
Dopacetamida



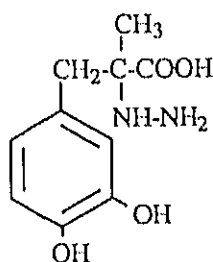
Quercetina



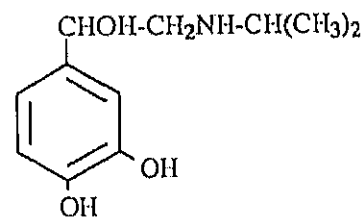
U-0521



Dopa



Carbidopa



Isoprenalina

Borchardt y col.<sup>87</sup> mostraron en 1982 que la presencia de grupos electroattractores en posición 5 del anillo aromático incrementaba significativamente la actividad como inhibidores de COMT de la isovainillina y el ácido isovainillínico; obteniéndose los mejores resultados cuando el sustituyente era un grupo nitró.

La sustitución del anillo aromático con sustituyentes con grupos atractores de electrones, particularmente en las posiciones 1 y 5, aumenta la afinidad de los inhibidores por COMT. Esta sustitución aumenta la acidez del catecol, favoreciendo la ionización del hidroxilo en posición 4; además, la disminución del  $pK_a$  de los hidroxilos fenólicos debe permitir que tengan lugar interacciones atractivas adicionales entre el inhibidor y el centro activo de la enzima. Asimismo, la sustitución en 5 por un grupo nitró parece transformar el producto catecólico en un pobre sustrato de COMT. La sustitución en esta posición por grupos

electroattractores de gran tamaño no tiene lugar, posiblemente debido a interacciones estéricas; sin embargo, cuando los sustituyentes están en posición 1 el centro activo de la enzima es capaz de acomodarlos aunque éstos sean bastante voluminosos. Al parecer, el tamaño y la hidrofobicidad de los sustituyentes en posición 1 conduce a un aumento de la actividad de los productos como inhibidores de COMT, mientras que grupos iónicos ejercen el efecto contrario. Basándose en esto, recientemente han sido descritos en la literatura una serie de productos que actúan como inhibidores de COMT potentes y selectivos<sup>9,10</sup>. Con algunos de estos productos, cuya estructura se indica en la figura 2 se están llevando a cabo en la actualidad ensayos *in vivo*.

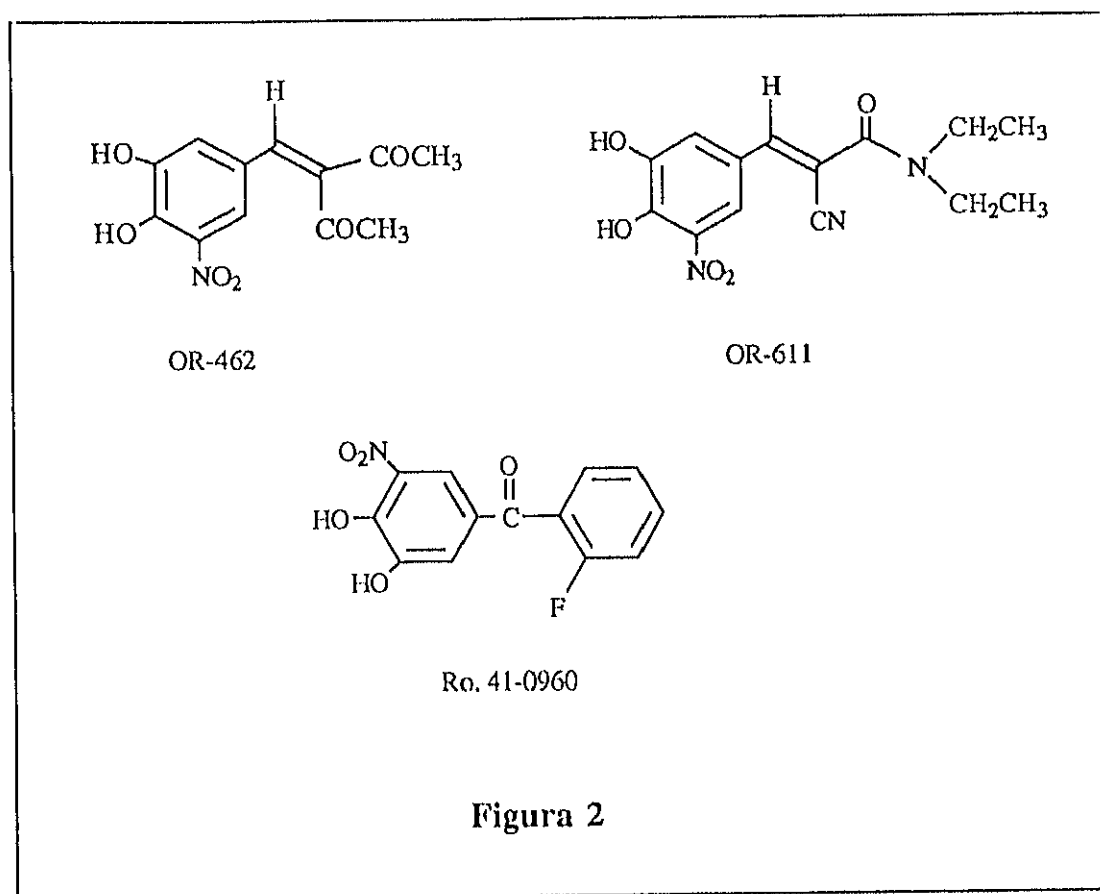
La 3-(3,4-dihidroxi-5-nitrobenziliden)-2,4-pentanodiona (OR-462 o nitecapone) es un inhibidor muy potente y selectivo de COMT y no es sustrato de la enzima<sup>88,89</sup>. Cuando es administrado en combinación con L-dopa y carbidopa es capaz de mantener altos los niveles de L-dopa reduciendo la excreción de metabolitos metilados de dopamina<sup>12,90</sup>. Además, el OR-462 posee baja toxicidad *in vivo*<sup>13,14</sup>.

La N,N-diethyl-2-ciano-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil)acrilamina (OR-611) es otro de los productos cuyos estudios farmacocinéticos *in vivo* están dando buenos resultados en la vía de su posible uso clínico<sup>12,13,15,90,91</sup>. Tanto el OR-611 como el anteriormente indicado OR-462 son inhibidores periféricos de COMT, ya que no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

La 2'-fluoro-3,4-dihidroxi-5-nitrobenzofenona (Ro. 41-0960) es otro nitroderivado de catecol con el que se están realizando estudios *in vivo*<sup>13,90</sup>. Este producto es un inhibidor de amplio espectro, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, y posee un valor de ID<sub>50</sub> bastante inferior a los descritos anteriormente, aunque resulta algo mas tóxico que aquellos.

La baja toxicidad de estos productos, así como los buenos resultados obtenidos hasta el momento en estudios dirigidos a su aplicación potencial en el tratamiento del Parkinson, hace de estos inhibidores candidatos a ser utilizados en clínica. Pero antes, es necesario ampliar los estudios con el fin de establecer y evaluar las consecuencias de posibles interacciones de estos compuestos con sustratos de COMT y con fármacos implicados en el metabolismo de neurotransmisores, así como la posible activación de otras rutas metabólicas cuando se inhibe COMT y L-dopa descarboxilasa<sup>62</sup>.





### 3.2.3. Otras estructuras.

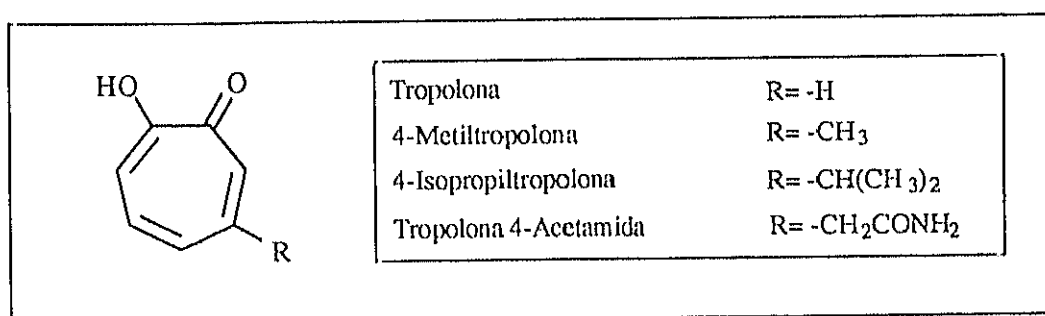
En este grupo se incluyen productos descritos en la literatura como inhibidores de COMT que se caracterizan por la carencia de grupos hidroxilos contiguos en su estructura aromática.

#### Tropolonas

La tropolona y derivados (4-metil- o 4-isopropiltropolona y tropolona-4-acetamida) son isómeros de catecol que actúan como inhibidores no competitivos de COMT<sup>74,79,92,93</sup>. Los numerosos estudios realizados con estos productos<sup>79,94</sup> parecen indicar que actúan como inhibidores *in vivo* de COMT, aunque su acción es corta; probablemente esto es debido a que

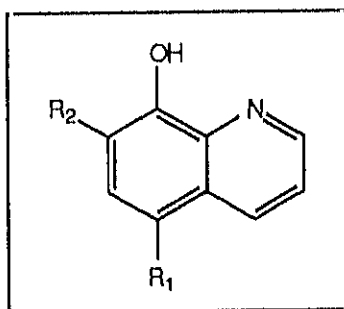
la unión enzima-inhibidor tiene lugar de forma reversible y es muy lábil. Por otro lado, las tropolonas son bastante tóxicas y no pueden ser utilizadas con fines clínicos.

Los resultados de inhibición obtenidos para tropolonas y pirogalol han sido tomados como referencia en numerosos trabajos.



### 8-Hidroxiquinolinas

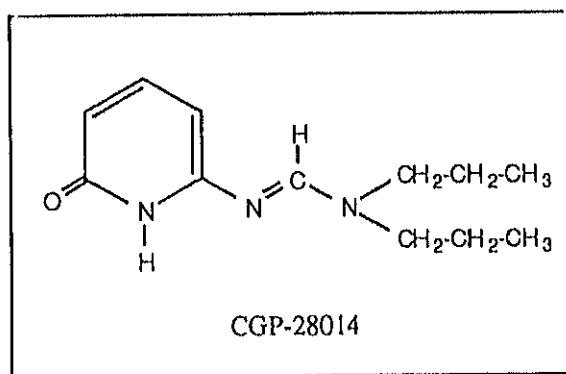
Estos productos se comportan como inhibidores *in vitro* de COMT algo más potentes que el pirogalol<sup>79,55</sup>. Hasta el momento no se han realizado estudios *in vivo* y se desconoce la importancia farmacológica de este tipo de compuestos.



### Pironas y piridonas

Este tipo de estructuras fueron descritas como inhibidores de COMT por Borchardt<sup>95</sup> en 1973 al estudiar una serie de 3-hidroxi-4-pironas, 3-hidroxi-2-piridonas y 3-hidroxi-4-piridonas como inhibidores de COMT de hígado de rata.

Recientemente se ha descrito en la literatura una piridona, la N<sup>2</sup>-(2-piridona-6-il)-N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-di-*n*-propilformamidina (CGP 28014), como potente inhibidor *in vivo* de COMT, no observándose inhibición *in vitro* de la enzima (sólo actúa como inhibidor a concentraciones del orden de milimoles)<sup>11,96,97</sup>. Al igual que ocurría con los nitroderivados comentados anteriormente, se ha observado que este compuesto conduce a un descenso importante en la producción de metoxiderivados cuando se administra junto con levodopa y un inhibidor de descarboxilasa<sup>15</sup>.



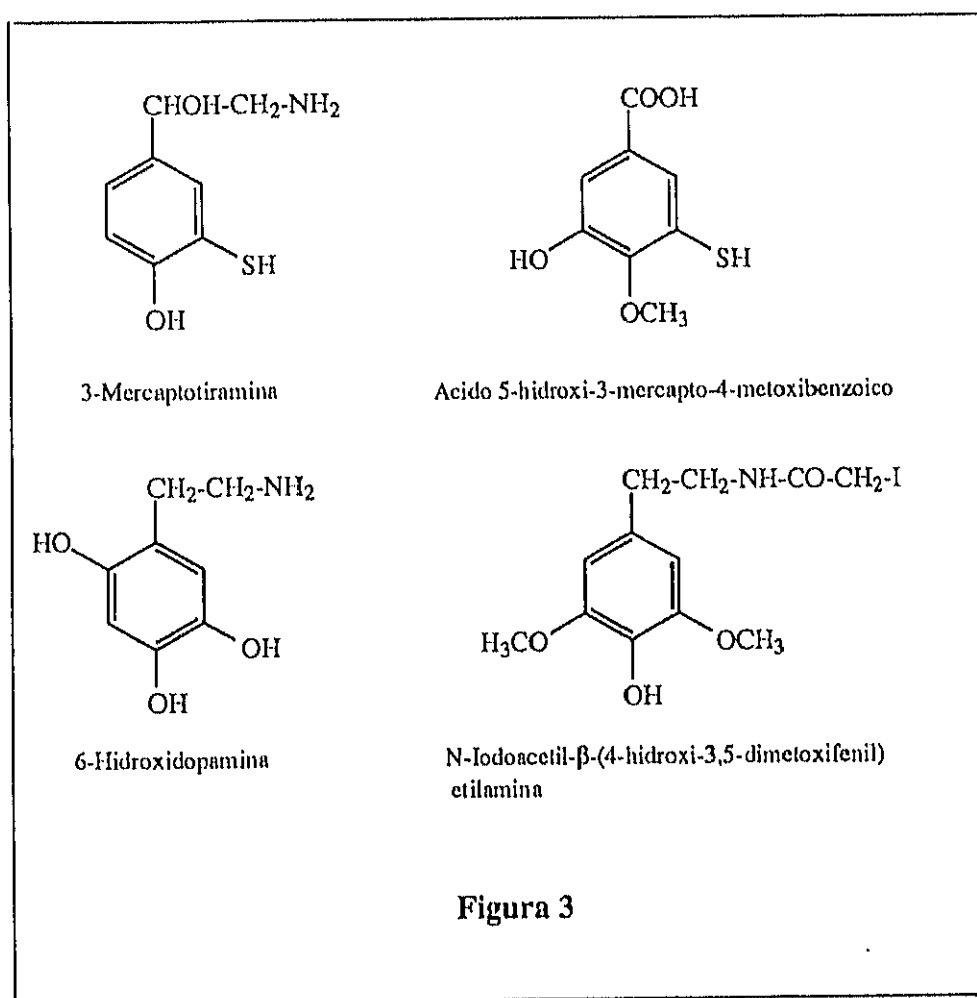
El CGP 28014 parece actuar como un débil inhibidor de COMT en la periferia cuando se encuentra en presencia de carbidopa y L-dopa, siendo muy efectivo en cerebro. Su principal metabolito, la 2-amino-6-hidroxipiridina, no actúa como inhibidor de COMT. Aunque el mecanismo de acción de este producto se desconoce hasta el momento, un estudio en el que se intentan establecer las propiedades *in vivo* de tres inhibidores de COMT (OR-611, Ro. 40-7592 y CGP 28014), realizado por Männistö y col.<sup>15</sup> en 1992, parece indicar que esta piridona no se comporta como un inhibidor de COMT propiamente dicho, sino que actúa inhibiendo la transferencia de los sustratos a la enzima.

#### 3.2.4. Inhibidores irreversibles .

La inactivación de COMT por reactivos de grupos sulfhidrilo<sup>1,98</sup> sugirió la existencia de al menos un grupo SH esencial para la actividad enzimática, por lo que es de prever que reactivos de grupos SH inactiven irreversiblemente la enzima.

Así la 3-mercaptotiramina actúa como inhibidor de COMT y no es sustrato de la enzima<sup>99</sup>. Se postula que la inhibición tiene lugar por reacción del producto con un residuo de cisteína situado en el centro activo de la enzima o próximo a él, formándose un puente disulfuro.

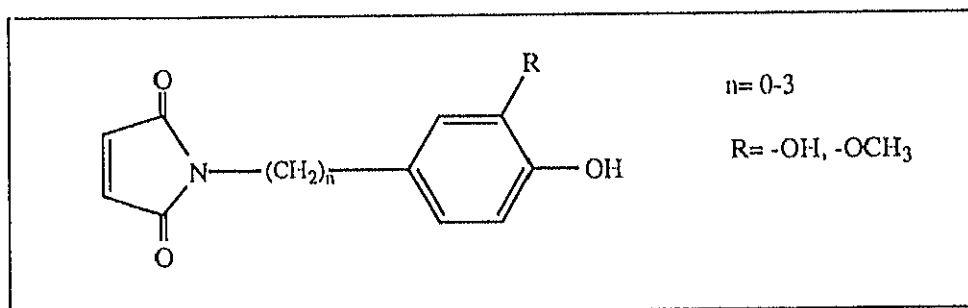
En la figura 3 se muestra la estructura de algunos inhibidores irreversibles de COMT.



Con el objetivo de obtener inhibidores irreversibles de COMT, en nuestro laboratorio se prepararon una serie de N-haloacetilalquilaminas con distintos sustituyentes en posiciones 3 y 4 del anillo aromático variando la distancia entre el anillo y el halógeno, observándose que, aunque todos ellos actuaban como inhibidores irreversibles de COMT, los mejores resultados se obtenían cuando el halógeno era yoduro y carecía de cadena espaciadora<sup>100</sup>. Estudios

paralelos realizados por Borchardt<sup>101</sup> con N-haloacetilderivados de 4-hidroxi-3,5-dimetoxi- y 5-hidroxi-3,4-dimetoxifenilalquilaminas, mostraron que la cadena espaciadora entre el anillo aromático y la iodoacetamida no influyó significativamente en la velocidad de inactivación de COMT por estos productos.

Más recientemente, en nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios de inhibición de COMT por N-(3,4-dihidroxifenil)maleimidas y N-(4-hidroxi-3-metoxifenil)maleimidas<sup>16,17</sup> observándose que estos compuestos inhiben irreversiblemente la enzima siguiendo un proceso en dos fases: una rápida y otra lenta. Este comportamiento bifásico sugiere que estos productos modifican dos grupos SH de la enzima con diferente reactividad.



## ***OBJETIVOS***

Las estructuras a estudiar en el trabajo de investigación que se presenta en esta Memoria fueron seleccionadas en base a los antecedentes bibliográficos existentes sobre inhibidores de COMT y a la investigación que se realiza en nuestro grupo de trabajo en relación con este tema.

En un trabajo previo sobre inhibidores de COMT, llevado a cabo en nuestro laboratorio, se realizó la preparación y estudio como inhibidores de esta enzima una serie de derivados de maleimida, que se caracterizaban por ser análogos estructurales de catecol o guayacol y portadores de un anillo de maleimida como grupo reactivo de grupos SH. Los ensayos realizados con estos compuestos mostraron que actuaban como inhibidores irreversibles de COMT, aunque con valores de constantes de inhibición elevados ( $\approx 10^{-5}$  M); asimismo, los valores calculados para las constantes de velocidad del proceso irreversible indicaban que este proceso era muy rápido. También hay que tener en cuenta que el grupo maleimida es demasiado lábil para conducir a inhibidores útiles *in vivo*.

Es conocido desde hace algún tiempo que en derivados de guayacol y catecol sustituidos en posición 1, la introducción de sustituyentes que atraen electrones en posición 5 aumenta considerablemente la afinidad de estos productos por el centro activo de la enzima<sup>9,10,87</sup>. Tomando como referencia estos antecedentes, así como otros aspectos de la enzima y su inhibición descritos en el capítulo anterior, se proyectó el desarrollo del trabajo que se presenta en esta Memoria:

- Síntesis de nitroderivados de hidroximetoxi y dihidroxibenzaldehído. Estudio de la inhibición reversible de COMT por estos productos con el fin de establecer la influencia de la posición relativa de los distintos grupos en su actividad como inhibidores de COMT.

- Síntesis de 1-vinilderivados de nitroguayacol y nitrocatecol, con el objeto de obtener compuestos de alta afinidad por la enzima, susceptibles de reaccionar con grupos SH, y posterior estudio de su actividad como inhibidores de COMT.

- Estudio de la cinética de inhibición de COMT por algunos de los vinilderivados ensayados.

- Síntesis de nuevos derivados vinílicos de guayacol en los que se incremente la distancia entre el anillo aromático y el doble enlace, con el fin de obtener estructuras más flexibles. Ensayo de estos productos como inhibidores irreversibles de COMT.



## ***RESULTADOS Y DISCUSION***

## **1. SINTESIS DE NITRODERIVADOS DE HIDROXIMETOXI Y DIHIDROXIBENZALDEHIDO**

Como ya se ha indicado anteriormente, la mayor parte de los productos ensayados actualmente *in vivo* como inhibidores de COMT son derivados de 3,4-dihidroxibenceno sustituido en posiciones 1 y 5, siendo el sustituyente en posición 5 un grupo nitró<sup>12-15</sup>. Se ha evaluado la actividad biológica de una serie de nitroderivados de dihidroxi e hidroximetoxibenzaldehído con el fin de investigar como influye la posición del grupo nitró y las posiciones relativas de diferentes grupos en la actividad de estos compuestos como inhibidores de COMT *in vitro*. El paso previo para realizar este estudio es la síntesis de los derivados a estudiar.

Los hidroximetoxinitrobenzaldehídos y los dihidroxinitrobenzaldehídos indicados en la figura 4 se sintetizaron tomando como productos de partida el 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina), el 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (isovainillina) y el 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (*o*-vainillina), con la excepción del 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído.

La síntesis de los nitroderivados a estudiar se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos en la literatura para la obtención de algunos de ellos, o mediante procedimientos estándar; exceptuando la 5-nitrovainillina (2) que es un producto comercial (Aldrich Chemical).

Los distintos hidroximetoxinitrobenzaldehídos fueron sintetizados por nitración directa del correspondiente benzaldehído o por protección del grupo hidroxilo, seguida de nitración y eliminación del grupo protector. Un proceso adicional de desmetilación conduce al correspondiente derivado de dihidroxinitrobenzaldehído.

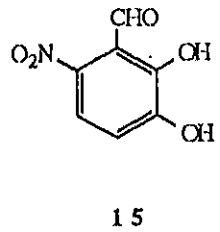
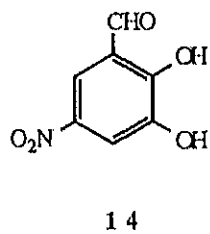
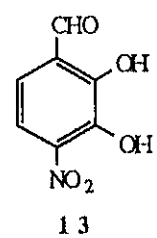
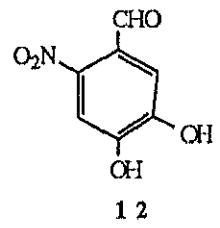
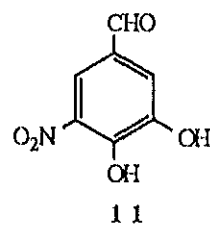
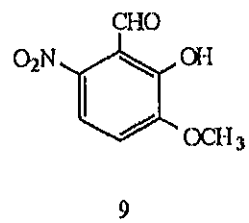
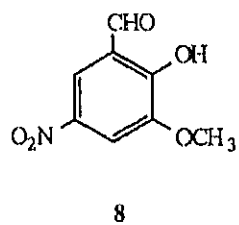
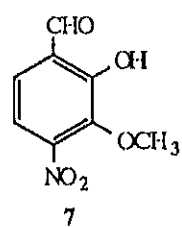
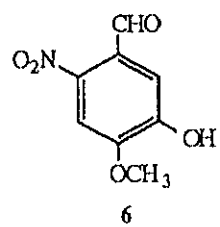
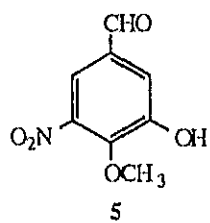
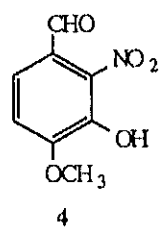
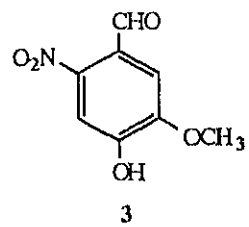
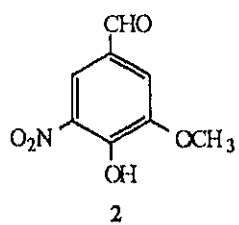
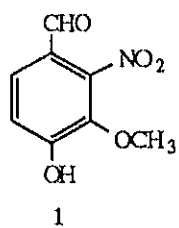
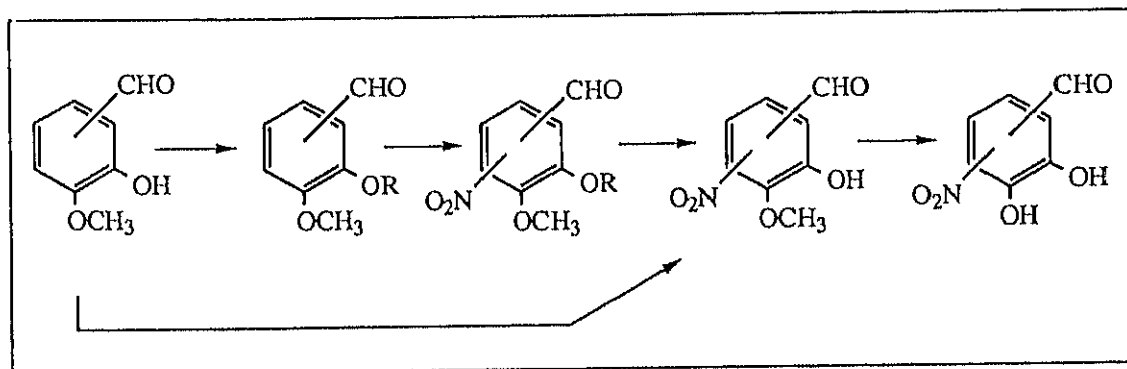
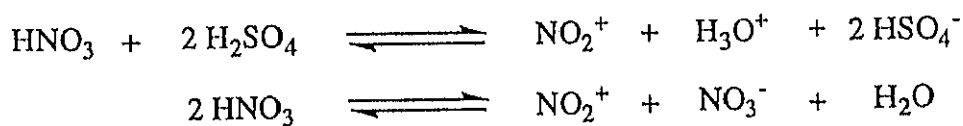


Figura 4



Los procesos de nitración de anillos aromáticos pueden tener lugar con una gran variedad de agentes nitrantes<sup>102</sup>. El reactivo más común es una mezcla de ácido nítrico concentrado y ácido sulfúrico, pero para sustratos activos la reacción puede llevarse a cabo con ácido nítrico solo o con ácido nítrico en agua, ácido acético o anhídrido acético; así, en el caso de aminas, fenoles y pirroles es necesario utilizar estas últimas condiciones debido a que la mezcla de ácidos nítrico y sulfúrico podría oxidar los sustratos. La especie atacante en estos reactivos de nitración es el ión nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ); así, cuando la reacción se realiza utilizando la mezcla de ácidos nítrico y sulfúrico tiene lugar una reacción ácido-base en la cual el ácido nítrico es la especie que actúa como base. Asimismo, cuando se utiliza ácido nítrico solo, también tiene lugar una reacción de equilibrio ácido-base en la cual una molécula de nítrico actúa como ácido y otra como base; en este caso, el equilibrio se encuentra desplazado hacia la izquierda, alcanzando alrededor de un 4% de ionización, la cantidad de especie activa formada es suficiente para que se lleve a cabo el proceso de nitración. Un equilibrio análogo al indicado en el esquema tiene lugar, en menor extensión, cuando se utilizan disolventes orgánicos en el proceso de nitración.

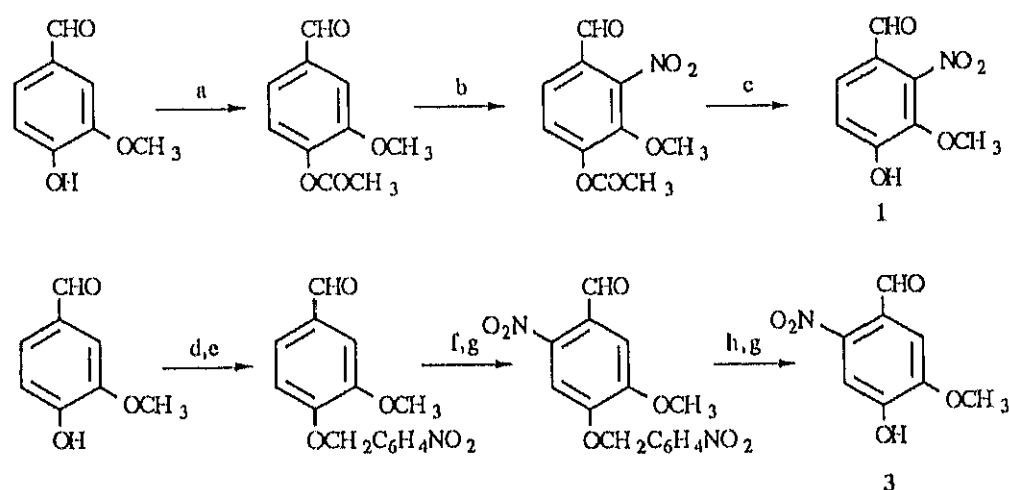


En nuestro caso, la mayoría de las reacciones se llevaron a cabo por nitración con ácido nítrico fumante de los compuestos, con o sin protección previa del grupo o grupos hidroxilos.

## 1.1. Síntesis de nitroderivados de hidroximetoxibenzaldehído

### 1.1.1. Nitroderivados de vainillina

La obtención de 2-nitrovainillina (1) y de 6-nitrovainillina (3) tuvo lugar siguiendo el procedimiento indicado en el esquema 4. Como ya se ha mencionado, la 5-nitrovainillina (2) es un producto comercial.



a. KOH, Ac<sub>2</sub>O. b. HNO<sub>3</sub> (f). c. Hidrólisis. d. BrCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-NO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. e. H<sub>2</sub>O.  
f. HNO<sub>3</sub>, AcOH g. H<sub>2</sub>O, 0°C. h. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

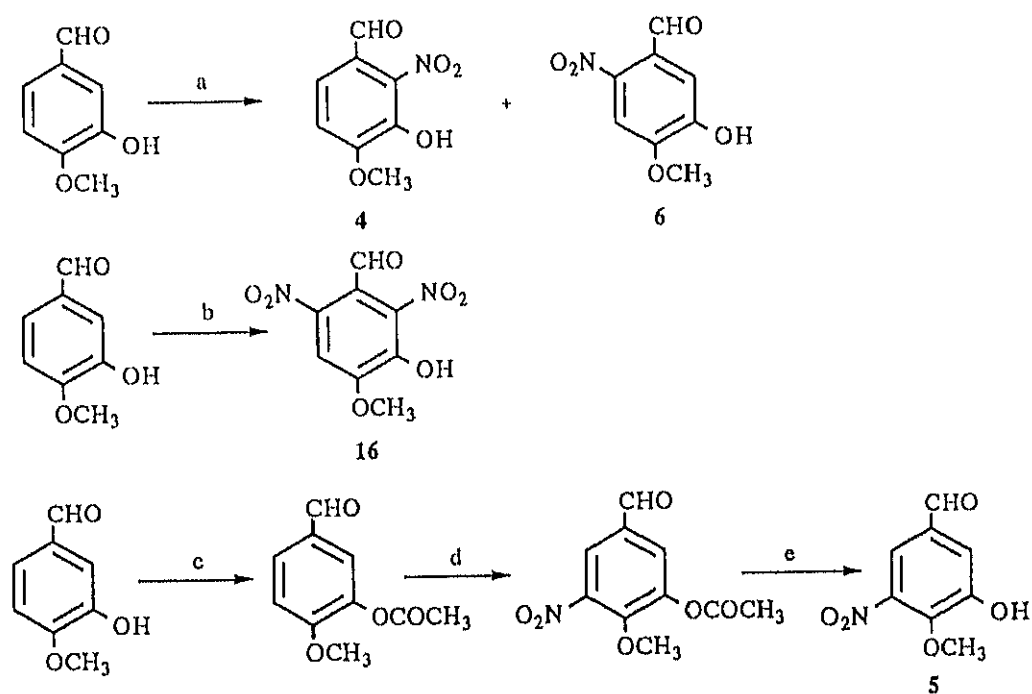
**Esquema 4**

La acetilación de vainillina, con anhídrido acético e hidróxido potásico 2N, condujo al *O*-acetilderivado correspondiente, cuya nitración con ácido nítrico fumante y posterior desacetilación permitió el aislamiento del producto nitrado en posición 2 (1)<sup>103,104</sup> con un rendimiento global del proceso del 55%.

En la obtención de 6-nitrovainillina (3)<sup>104,105</sup> el grupo protector de hidroxilos empleado fue el bromuro de 4-nitrobencilo. La nitración con ácido nítrico fumante del producto protegido y posterior eliminación del grupo protector permitió la obtención del producto 3 con un rendimiento global del 37%.

### 1.1.2. Nitroderivados de isovainillina

Los correspondientes nitroderivados en posiciones 2 y 6 (compuestos **4** y **6** respectivamente)<sup>106</sup> se obtuvieron por nitración directa de la isovainillina. Cuando el proceso de nitración se lleva a cabo con 1,2 equivalentes de ácido nítrico fumante se obtienen **4** y **6** en una proporción 1:2; estos productos fueron fácilmente separables por cromatografía en gel de sílice (con rendimientos del 27% y 51% respectivamente). Si la reacción tiene lugar con mayor exceso de agente nitrante el producto que se obtiene es la 2,6-dinitroisovainillina (**16**).



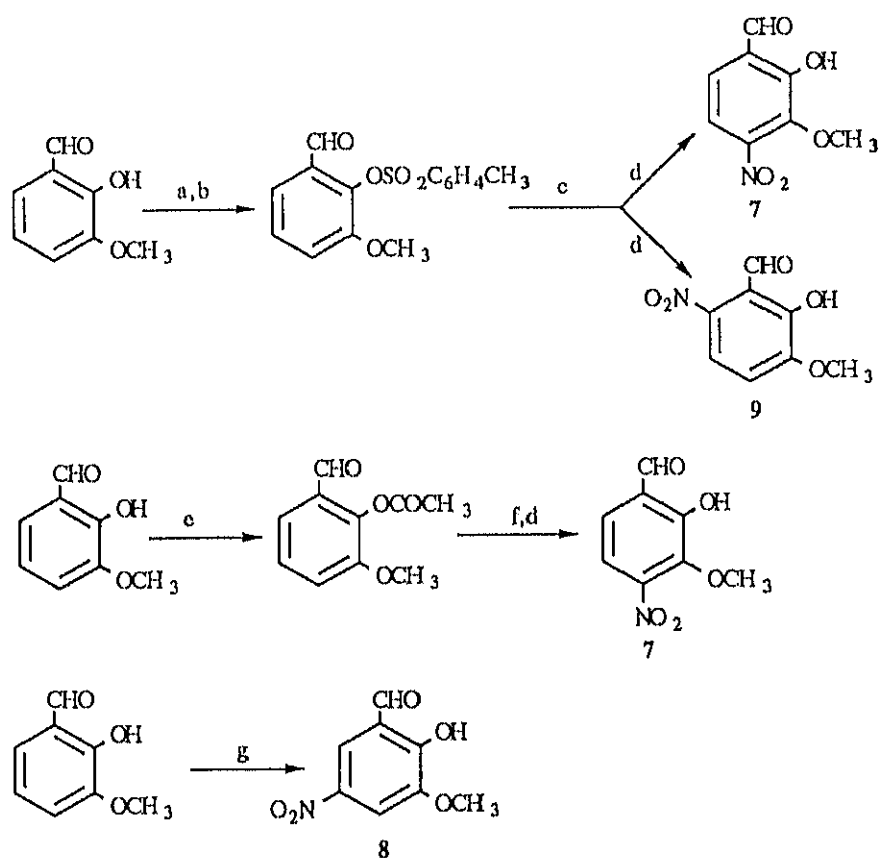
a. 1,2 eq HNO<sub>3</sub> (I), acetona. b. exc. HNO<sub>3</sub> (I). c. KOH, Ac<sub>2</sub>O. d. HNO<sub>3</sub> (I). e. hidrólisis

### Esquema 5

Por acetilación del grupo hidroxilo de la isovainillina, nitración del *O*-acetilderivado y posterior eliminación del grupo protector se obtuvo la 5-nitroisovainillina (**5**)<sup>106</sup> con un rendimiento global del proceso del 30%.

1.1.3. Nitroderivados de *o*-vainillina.

La nitración directa del anillo de *o*-vainillina con ácido nítrico fumante en ácido acético condujo, tras recristalización en agua del crudo de reacción, al 5-nitroderivado<sup>107</sup> (8) con un rendimiento del 63%.



a. NaOH, H<sub>2</sub>O. b. CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>Cl. c. HNO<sub>3</sub> (f). d. hidrólisis. e. Ac<sub>2</sub>O, pir.  
f. HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. g. HNO<sub>3</sub>, AcOH.

Esquema 6



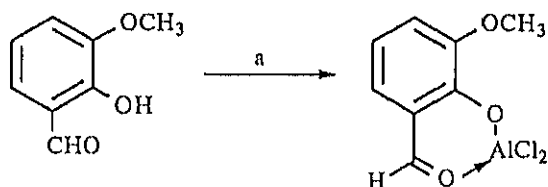
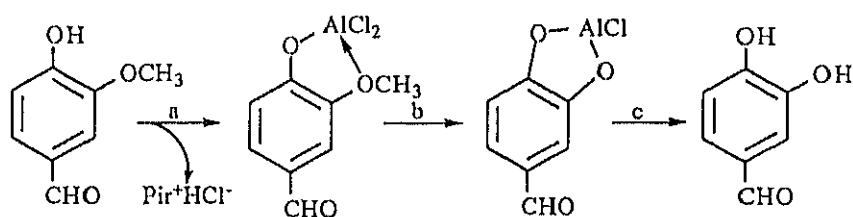
La 4-nitro-*o*-vainillina (7) y la 6-nitro-*o*-vainillina (9) se obtienen realizando una protección previa del grupo hidroxilo de la *o*-vainillina con cloruro de *p*-toluensulfonilo, seguido de nitración y posterior eliminación del grupo tosilo<sup>104,108</sup>; el proceso tiene lugar con un rendimiento global del 25% y 22% respectivamente. Asimismo, la 4-nitro-*o*-vainillina también se obtiene siguiendo un proceso de acetilación del grupo hidroxilo, nitración y posterior eliminación del grupo protector, no detectándose en el proceso la formación del correspondiente 6-nitroderivado<sup>109</sup>. Las distintas reacciones de nitración de *o*-vainillina se indican en el esquema 6.

## 1.2. Síntesis de nitroderivados de dihidroxibenzaldehído

La mayoría de estos productos fueron preparados por desprotección del grupo éter del correspondiente hidroximetoxinitrobenzaldehído precursor utilizando métodos convencionales<sup>110</sup>; excepto el 3,4-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (12) que se obtuvo por desprotección del grupo metilendioxi del piperonal.

### 1.2.1. Nitroderivados de 3,4-dihidroxibenzaldehído.

El 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído (10) se obtiene por ruptura del grupo éter de la 2-nitrovainillina<sup>111</sup>. El proceso tiene lugar tras cuatro días de agitación de la mezcla de reacción a temperatura ambiente, utilizando tricloruro de aluminio sublimado y piridina como reactivos, y diclorometano como disolvente. Otros procedimientos dirigidos a la desprotección del grupo hidroxilo de **1**, como son la ruptura del éter con tribromuro de boro complejoado con dimetilsulfuro o el tratamiento con ácido bromhídrico en ácido acético glacial a 120°C, resultaron infructuosos. El mecanismo propuesto para la desprotección con tricloruro de aluminio es el siguiente<sup>112</sup>:

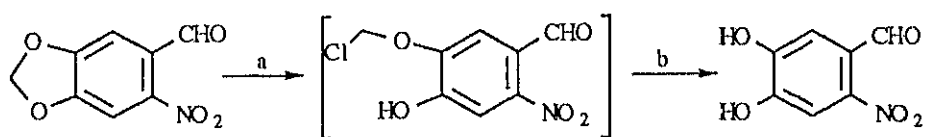


a.  $\text{AlCl}_3$ , piridina.. b. piridina. c.  $\text{H}^+$

Como puede observarse en el esquema mecanístico propuesto, este procedimiento no sería válido en el caso de los derivados de *o*-vainillina debido a que el complejo intermedio que se formaría sería el resultado de la complejación con el oxígeno carbonílico adyacente en lugar de hacerlo con el oxígeno hidroxílico, menos básico, por lo que no conduciría a la ruptura del grupo éter.

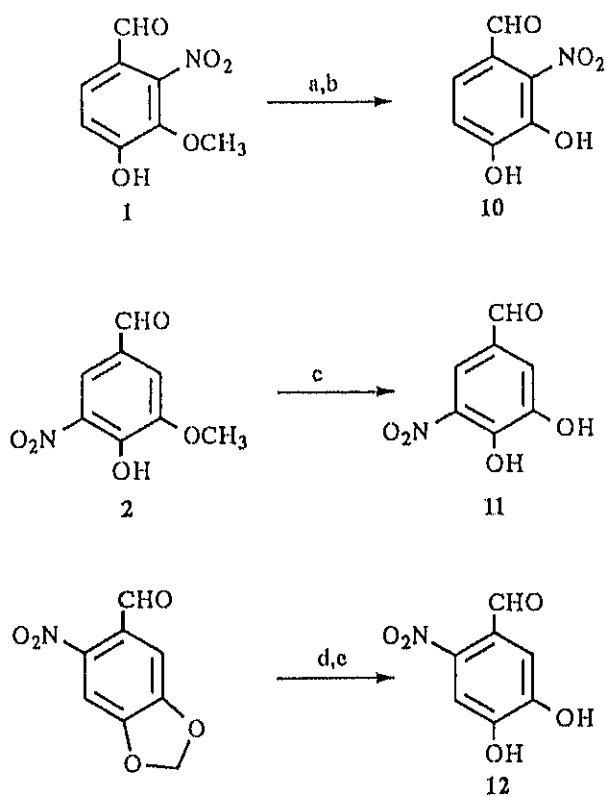
La síntesis de 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (**11**) se realizó partiendo de 5-nitro vainillina con ácido bromhídrico y ácido acético como codisolvente<sup>113</sup>, a una temperatura de 150 °C y 19 horas de reacción, obteniéndose **11** con el 61% de rendimiento.

En el caso del 3,4-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (**12**) el proceso de síntesis resulta más sencillo, tomando como producto de partida el 6-nitropiperonal<sup>114,115</sup> (producto comercial) en lugar de partir de 6-nitrovainillina o 6-nitroisovainillina. La ruptura del acetal se realiza con tricloruro de aluminio sublimado y dicloroetano seco como disolvente. Durante el proceso tiene lugar la formación de un intermedio clorometiléter, que es finalmente transformado en el dihidroxiderivado **12** por tratamiento con ácido. El proceso tiene lugar con un rendimiento del 88%.



a.  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ . b.  $\text{H}_3\text{O}^+$

El proceso sintético seguido para la obtención de los correspondientes nitroderivados de 3,4-dihidroxibenzaldehído se muestran en el esquema 7.

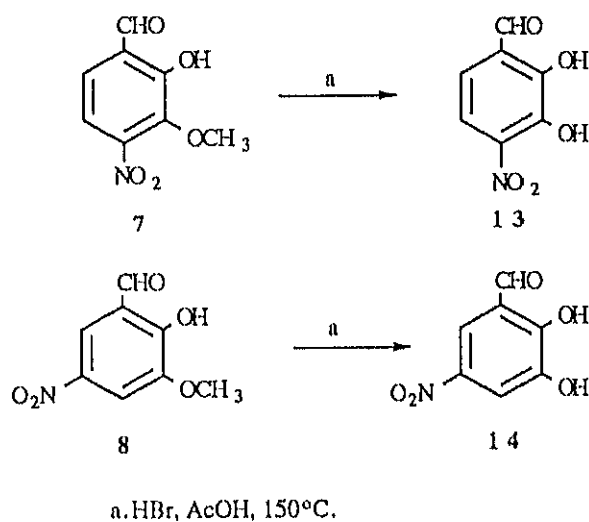


a.  $\text{AlCl}_3$ , pir,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . b.  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . c.  $\text{HBr}$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $150^\circ\text{C}$ .  
d.  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ . e.  $\text{HBr}$ .

**Esquema 7**

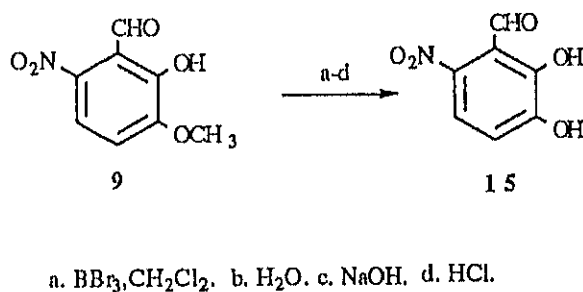
### 1.2.2. Nitroderivados de 2,3-dihidroxibenzaldehído.

El proceso sintético de estos productos se indica en el esquema 8.

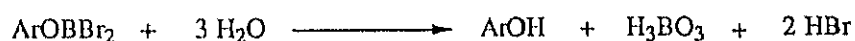
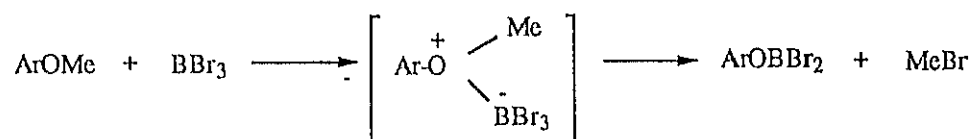


**Esquema 8**

La síntesis de 2,3-dihidroxi-4-nitrobenzaldehído (**13**) y 2,3-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (**14**) tuvo lugar mediante tratamiento con ácido bromhídrico y ácido acético glacial de los correspondientes nitroderivados de *o*-vainillina<sup>113</sup>.



Los intentos dirigidos a la obtención del 2,3-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (**15**) en condiciones análogas a las anteriormente descritas condujeron en todos los casos a crudos de reacción negros en los cuales no pudo detectarse el producto **15**. Cuando la reacción se llevó a cabo utilizando tribromuro de boro<sup>116,117</sup> como reactivo se obtuvo un crudo de reacción negro, cuya recristalización en agua permitió el aislamiento del producto deseado **15** con bajo rendimiento (22%); el rendimiento del proceso global fue del 8%. El mecanismo del proceso de ruptura del grupo éter con tribromuro de boro se indica a continuación.



## **2. ESTUDIOS DE INHIBICION DE COMT POR HIDROXIMETOXI Y DIHIDROXINITROBENZALDEHIDOS**

Dentro de este apartado se van a tratar tanto los ensayos dirigidos a la determinación de la actividad de estos productos como inhibidores de COMT, como la cinética de inhibición enzimática que presentan<sup>118-120</sup>.

En la reacción catalizada por COMT intervienen dos sustratos (SAM y un grupo aceptor de grupos metilo). Esta reacción parece transcurrir a través de un mecanismo secuencial en el cual el primer sustrato que se une es el donador del grupo metilo<sup>17</sup>.

Los estudios *in vitro* recogidos en esta memoria de tesis se han realizado con enzima parcialmente purificada de hígado de cerdo, utilizando catecol como sustrato aceptor de metilos. La purificación de COMT se realizó mediante precipitación con sulfato amónico y cromatografías convencionales<sup>121</sup> según el método descrito en la sección de materiales y métodos.

De forma general, las determinaciones de actividad enzimática de COMT se realizaron midiendo el incremento de productos O-metilados en la mezcla de reacción. En este estudio, la medida de actividad de la preparación enzimática se realizó siguiendo el método isotópico descrito por Zürcher y Da Prada<sup>122</sup>, modificado en nuestro laboratorio<sup>17</sup>; en el cual, utilizando <sup>3</sup>H-SAM, se mide la cantidad de <sup>3</sup>H-guayacol producido en el proceso enzimático.

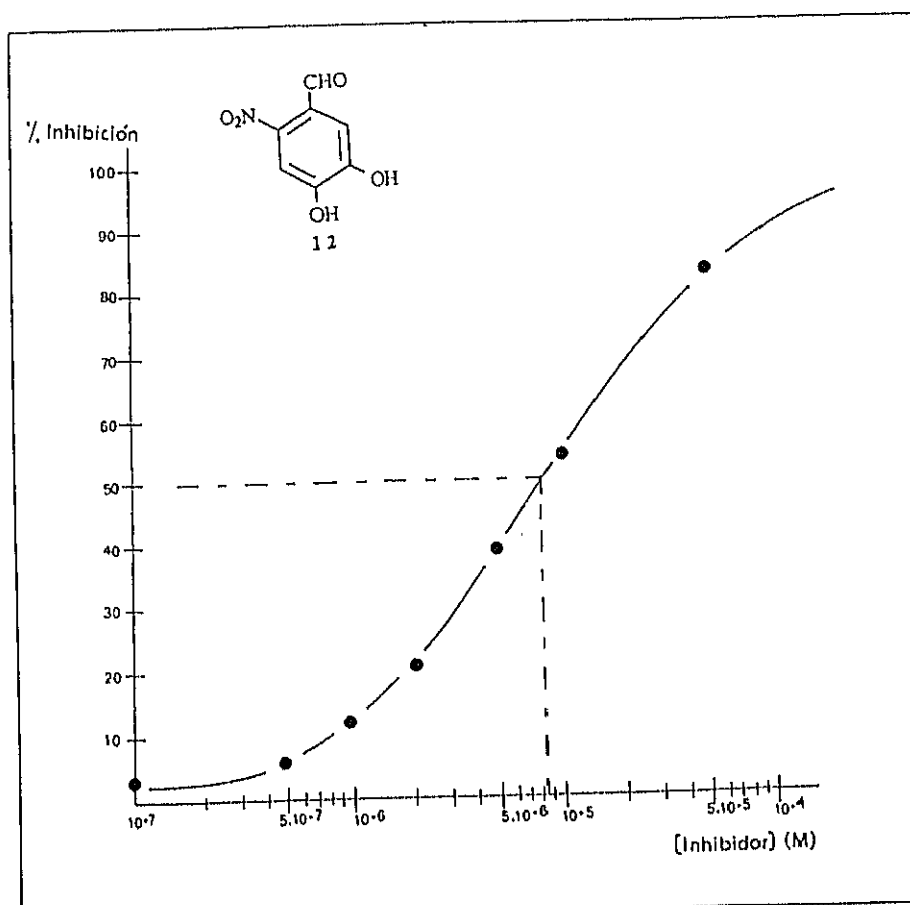
### 2.1. Cálculo de IC<sub>50</sub>.

Para determinar cuales de los productos sintetizados actúan como inhibidores de COMT, se realizó un estudio de inhibición previo con dos concentraciones diferentes de inhibidor ( $5 \times 10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-7}$  M) y en dos condiciones: sin pre-incubación de la enzima con el inhibidor y con incubación de ambos a 37°C durante 15 min.

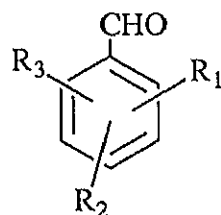
Como resultado de este estudio se observó que, a una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M, solamente un derivado de hidroximetoxinitrobenzaldehído, la 5-nitroisovainillina (5), inhibe la actividad enzimática; los productos que no presentaban actividad a esta concentración fueron descartados para posteriores estudios. Todos los dihidroxinitrobenzaldehídos resultaron activos como inhibidores. Para una concentración de inhibidor, la inhibición no era dependiente del tiempo; es decir, el porcentaje de inhibición observado tras incubar 15 min a 37 °C fue el mismo que sin incubación, lo que sugiere que estos compuestos actúan como inhibidores reversibles de COMT.

A continuación se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> (concentración de inhibidor que produce un 50% de inhibición de la actividad enzimática). Dicho cálculo se llevó a cabo mediante representación gráfica del porcentaje de inhibición observado a distintas concentraciones del inhibidor frente a estas concentraciones. Como ejemplo, a continuación se muestra la gráfica obtenida para la determinación del valores de IC<sub>50</sub> con el compuesto 12.



Cálculo de la actividad de **12** como inhibidor de COMT

En la tabla 1 se indica la estructura de los compuestos sintetizados y los valores de  $IC_{50}$  encontrados para los que mostraron actividad como inhibidores de COMT. La inhibición producida por los productos **11** y **14** ya había sido descrita anteriormente<sup>9,10</sup>. Si comparamos los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para estos productos con los publicados, observamos una gran diferencia entre ellos:  $2 \times 10^{-6}$  M frente a los valores de  $2 \times 10^{-8}$  y  $8 \times 10^{-8}$  M descritos para el compuesto **11**<sup>9,10</sup>, y  $2 \times 10^{-6}$  M frente a  $1,6 \times 10^{-7}$  M descrito para **14**<sup>10</sup>. Esta diferencia en los valores de  $IC_{50}$  puede deberse a la distinta procedencia de COMT: hígado de cerdo o hígado de rata. Asimismo, el valor de  $K_m$  determinado para el sustrato catecol fue de  $2,2 \times 10^{-3} \pm 0,2$  M<sup>17</sup>, un valor 5 veces mayor que el observado cuando se utiliza COMT aislada de hígado de rata<sup>122</sup>, y unas 50 veces el obtenido con enzima aislada de placenta humana<sup>123</sup> (tabla 2).

Tabla 1. Valores de IC<sub>50</sub>.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Actividad como inhibidores de COMT. IC <sub>50</sub> (M)
1	2-NO <sub>2</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	4-OH	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
2	5-NO <sub>2</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	4-OH	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
3	6-NO <sub>2</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	4-OH	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
4	2-NO <sub>2</sub>	3-OH	4-OCH <sub>3</sub>	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
5	5-NO <sub>2</sub>	3-OH	4-OCH <sub>3</sub>	3,4 x 10 <sup>-5</sup>
6	6-NO <sub>2</sub>	3-OH	4-OCH <sub>3</sub>	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
7	4-NO <sub>2</sub>	2-OH	3-OCH <sub>3</sub>	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
8	5-NO <sub>2</sub>	2-OH	3-OCH <sub>3</sub>	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
9	6-NO <sub>2</sub>	2-OH	3-OCH <sub>3</sub>	> > 5,0 x 10 <sup>-5</sup>
10	2-NO <sub>2</sub>	3-OH	4-OH	1,5 x 10 <sup>-6</sup>
11	5-NO <sub>2</sub>	3-OH	4-OH	2,0 x 10 <sup>-6</sup>
12	6-NO <sub>2</sub>	3-OH	4-OH	8,5 x 10 <sup>-6</sup>
13	4-NO <sub>2</sub>	2-OH	3-OH	1,5 x 10 <sup>-6</sup>
14	5-NO <sub>2</sub>	2-OH	3-OH	2,1 x 10 <sup>-6</sup>
15	6-NO <sub>2</sub>	2-OH	3-OH	1,0 x 10 <sup>-5</sup>

Comparando la afinidad del catecol con la de otros sustratos fisiológicos se observó que, en nuestras condiciones de trabajo, la afinidad del catecol por la enzima es muy baja. En la tabla 2 se indican los valores de las constantes cinéticas observados para SAM y para el sustrato aceptor de metilo en la reacción catalizada por COMT, en función del sustrato utilizado y de la fuente de enzima. Además, la naturaleza del sustrato catecol empleado también puede influir en el valor de  $IC_{50}$  observado para un mismo compuesto; así, los valores de  $IC_{50}$  determinados para el compuesto **11** cuando se utiliza como sustrato aceptor de metilo ácido 3,4-dihidroxibenzoico o catecol es de  $2 \times 10^{-8} M^9$  y  $8 \times 10^{-8} M^{10}$  respectivamente.

**Tabla 2:** Valores de las constantes cinéticas obtenidos para SAM y el sustrato catecol en diferentes estudios.

$K_m$ SAM (M)	$K_m$ Catecol (M)	Sustrato catecol	COMT	Ref.
$10^{-4}$	$2 \times 10^{-3}$	Catecol	hígado de cerdo	17
$4 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	Catecol	hígado de rata	122
$5 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$	Catecol	placenta humana	123
$3 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-4}$	Adrenalina	hígado de rata	52
$10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	Adrenalina	hígado de rata	53
$3 \times 10^{-5}$	$9 \times 10^{-5}$	ácido 3,4-dihidroxibenzoico	hígado de rata	54
$2 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-5}$	ácido 3,4-dihidroxibenzoico	cerebro de rata	57
$9 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-4}$	Dopamina	cerebro humano	58
$3 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$	Dopamina	cerebro humano*	56

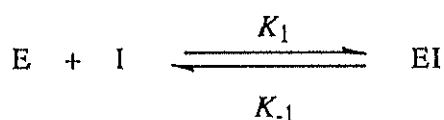
\* COMT unida a membrana

## 2.2. Estudios cinéticos de la inhibición de COMT

Estos estudios se realizaron con el fin de establecer la influencia de la posición relativa del grupo nitro de los dihidroxinitrobenzaldehídos en su actividad como inhibidores de COMT. Antes de comentar en detalle estos resultados, se describen brevemente los distintos tipos de inhibición reversible existentes.

### 2.2.1. Inhibición reversible

Un compuesto es inhibidor reversible cuando la unión con la enzima tiene lugar sin formación de enlace covalente y el efecto del inhibidor se anula por diálisis, dilución o filtración en gel. La inhibición reversible se caracteriza por un equilibrio entre la enzima y el inhibidor libres y el complejo enzima-inhibidor y viene definido por una constante que se correlaciona con la afinidad. La efectividad del inhibidor es normalmente establecida por el valor de su constante de inhibición  $K_I$  ( $K_{-1}/K_1$ ).

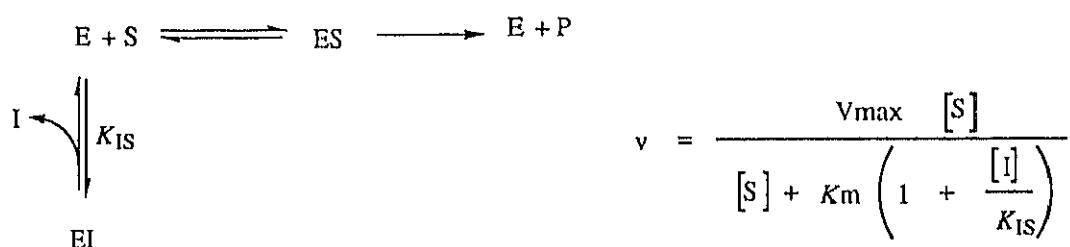


Los derivados de hidroximetoxi y dihidroxinitrobenzaldehído estudiados actúan como inhibidores reversibles de la enzima.

Básicamente existen tres tipos de inhibición reversible:

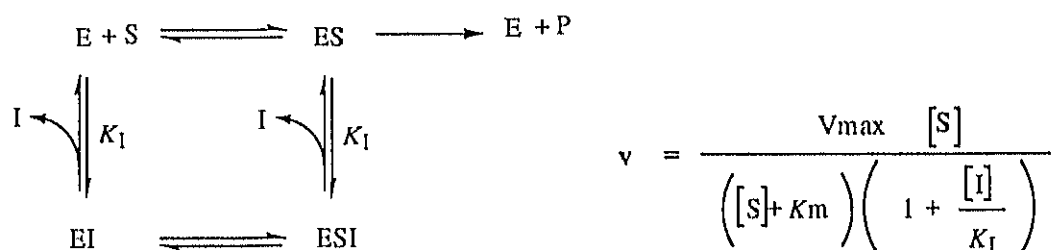
#### A. Inhibición competitiva

Actúan como inhibidores competitivos aquellos compuestos que, debido a su similitud estructural con el sustrato, compiten con él por el centro activo de la enzima, o cuando el inhibidor se une a la enzima impidiendo la unión del sustrato. El grado de inhibición dependerá de la concentración del sustrato y de las afinidades relativas del sustrato y el inhibidor por la enzima.

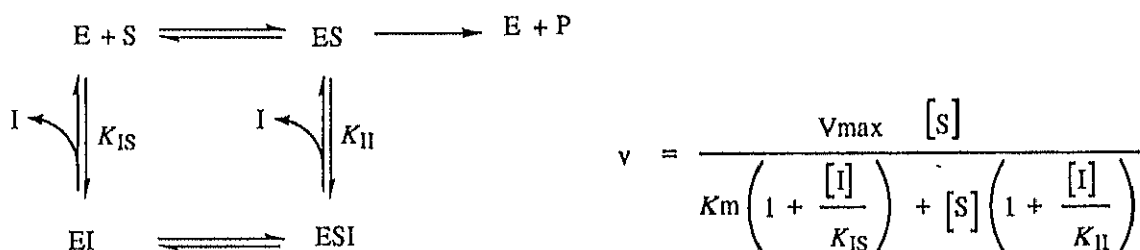


### B. Inhibición no competitiva y mixta

Se da inhibición no competitiva cuando el inhibidor puede unirse con igual afinidad a la enzima libre o al complejo enzima sustrato ( $K_{\text{IS}} = K_{\text{II}} = K_{\text{I}}$ ).

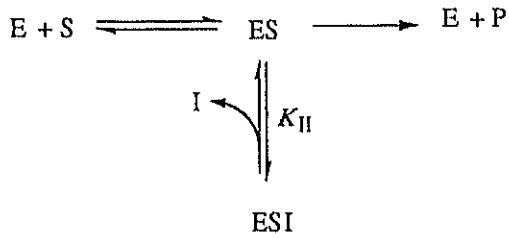


La inhibición es mixta cuando el valor de  $K_{\text{II}}$  difiere del observado para  $K_{\text{IS}}$ . En este caso, la dependencia de la inhibición del aumento de la concentración de sustrato guarda relación con los valores relativos de las dos constantes.



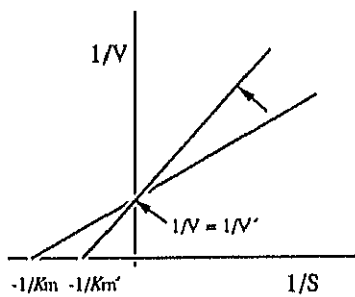
### C. Inhibición acompetitiva

Se observa este tipo de inhibición cuando la unión reversible tiene lugar únicamente sobre el complejo enzima-sustrato.

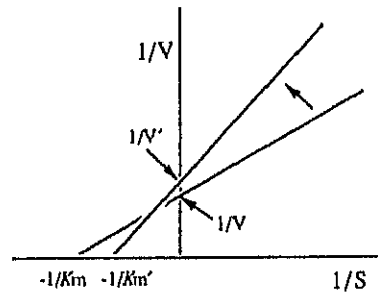


$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_{II}} \right)}$$

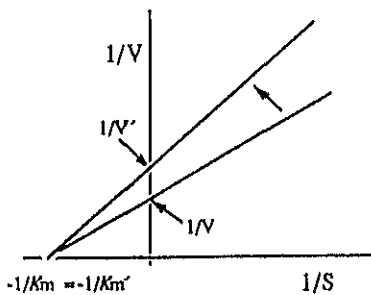
Existen distintas representaciones gráficas que, basándose en la ecuación de Michaelis-Menten, se utilizan para establecer el tipo de inhibición reversible que tiene lugar y el valor de las constantes cinéticas del proceso. Cuando se representa el inverso de la velocidad frente al inverso de la concentración de sustrato (gráfica de Lineweaver-Burk)<sup>124</sup>, a distintas concentraciones de inhibidor, se obtiene una serie de líneas rectas que se cruzan en un punto o que son paralelas entre sí, permitiendo establecer el tipo de inhibición reversible que tiene lugar. Los tipos de representaciones gráficas que se obtienen y los cálculos de los valores de los parámetros de inhibición para cada uno de los tipos de inhibición reversible se muestran a continuación.



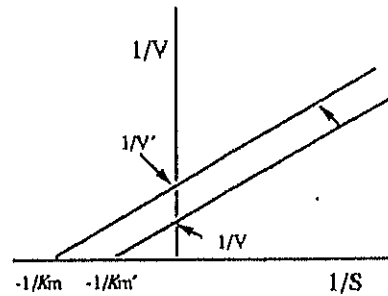
COMPETITIVA



MIXTA



NO COMPETITIVA



ACOMPETITIVA

### 2.2.2. Inhibición reversible de COMT por nitroderivados de hidroximetoxi y dihidroxibenzaldehído

Los patrones de inhibición para los compuestos activos se estudiaron en función de las concentraciones de catecol y de SAM. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.

En las condiciones de ensayo descritas en la parte experimental, el único análogo de guayacol activo (**5**) actúa como inhibidor no competitivo de COMT con respecto al catecol (tabla 3). Este resultado no es sorprendente por tratarse de un análogo del producto de reacción en vez de un análogo del sustrato; no obstante, está en desacuerdo con la inhibición competitiva descrita por Borchardt y col.<sup>87</sup> para este compuesto respecto al sustrato catecólico. Asimismo, este resultado concuerda con el descrito para otros análogos de guayacol<sup>17,87,122</sup>, los cuales presentan interacciones con COMT no competitivas o mixtas. En la figura 5 se muestran las representaciones de Lineweaver-Burk para el producto **5**.

Sorprendentemente, los dihidroxinitrobenzaldehídos (productos análogos del sustrato catecol) actúan como inhibidores mixtos frente a catecol. El hecho de que la presencia de dos grupos nitro en el anillo de catecol dé lugar a inhibidores competitivos con el sustrato catecólico, parece indicar que los resultados obtenidos con dihidroxinitrobenzaldehídos pueden deberse a la presencia de un grupo aldehído en posición 1 del anillo aromático, el cual puede alterar el modo de interacción del inhibidor con el centro activo de la enzima. Cuando se estudiaron los patrones de inhibición de COMT frente a SAM como sustrato se observó inhibición acompetitiva en todos los casos. La figura 6 muestra las representaciones gráficas obtenidas para 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (**11**), obteniéndose representaciones análogas con el resto de los derivados nitrados de dihidroxibenzaldehído.

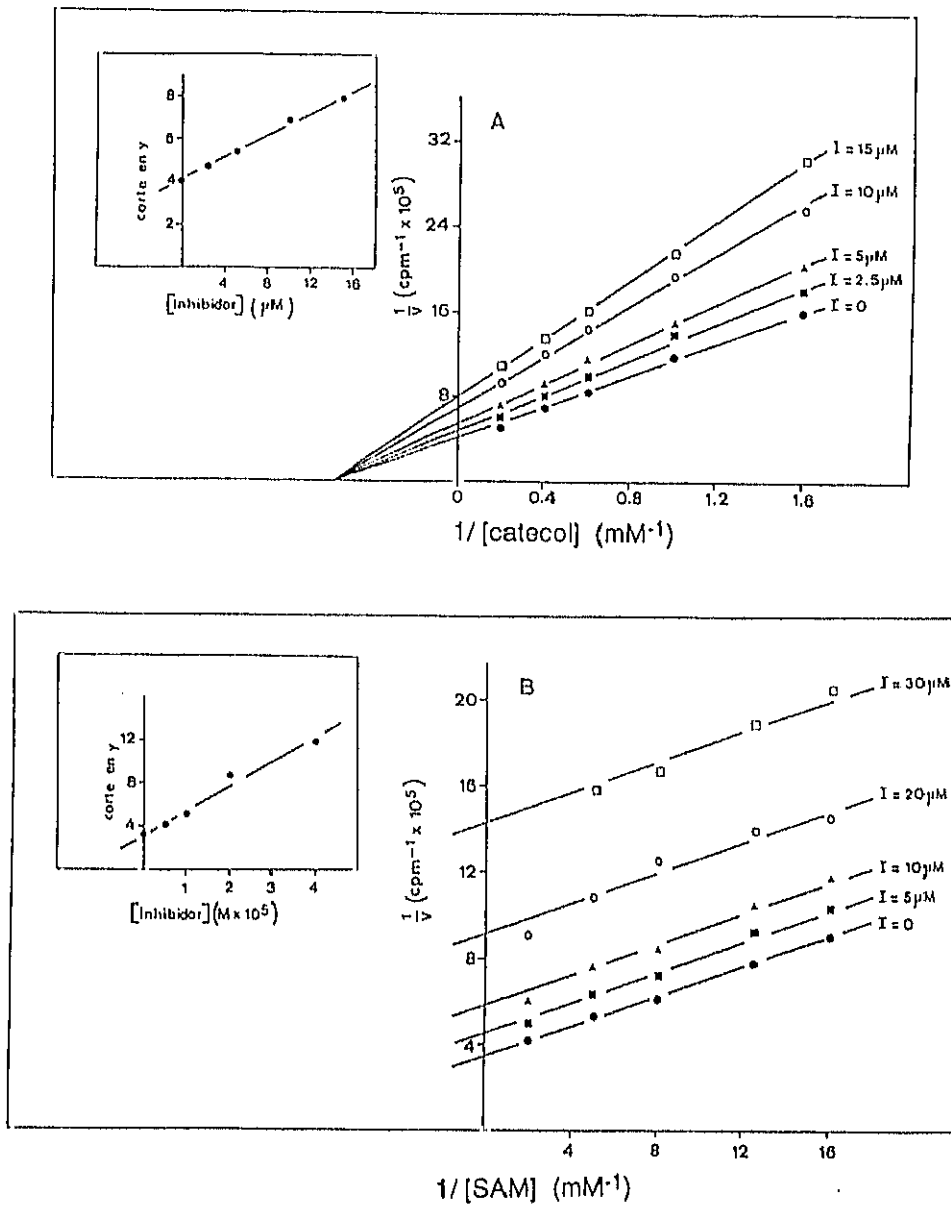
Los datos cinéticos obtenidos para los distintos nitrobenzaldehídos estudiados muestran que todos los dihidroxinitrobenzaldehídos actúan como inhibidores potentes de COMT, con valores de  $K_i$  del orden de  $\mu\text{molar}$ , y su actividad depende de la posición del grupo nitro. De estos resultados se puede concluir que la posición de un grupo nitro en 5 no es crítica para obtener la máxima actividad, como se creía hasta el momento, ya que los nitroderivados más activos como inhibidores de COMT son aquellos que tienen el grupo nitro en posición *orto* respecto a uno de los grupos hidroxilos presentes<sup>125</sup> (**10**, **11**, **13**); por tanto, la posición en 5 de un nitro, que está permitiendo el desarrollo de inhibidores de gran actividad<sup>9,10</sup>, sólo es una de las tres posiciones que han resultado ser más favorables para la citada sustitución.

**Tabla 3:** Inhibición reversible de COMT por nitroderivados de hidroximetoxi y dihidroxibenzaldehído.

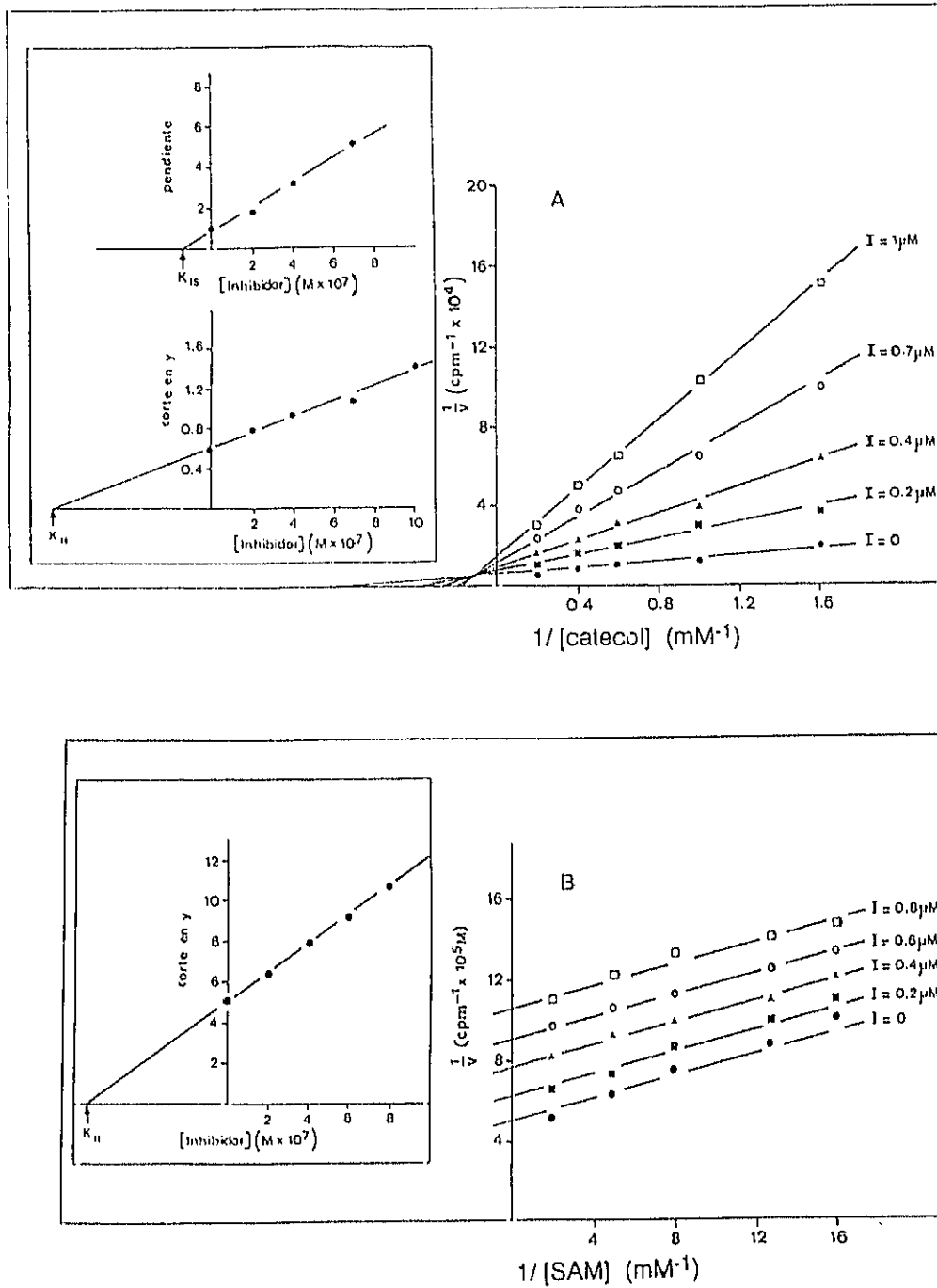
Inhibidor	SAM	Catecol	Inhibición	Constante de Inhibición $\pm$ E.M. (M)
5	Variable	Saturación	AC	$K_I = 1,35 \times 10^{-5} \pm 0,07$
	Saturación	Variable	NC	$K_I = 1,72 \times 10^{-5} \pm 0,23$
10	Variable	Saturación	AC	$K_{II} = 6,78 \times 10^{-7} \pm 0,29$
	Saturación	Variable	M	$K_{II} = 4,97 \times 10^{-7} \pm 1,78$
				$K_{IS} = 1,68 \times 10^{-7} \pm 0,27$
11	Variable	Saturación	AC	$K_{II} = 6,61 \times 10^{-7} \pm 0,22$
	Saturación	Variable	M	$K_{II} = 8,16 \times 10^{-7} \pm 0,20$
				$K_{IS} = 1,38 \times 10^{-7} \pm 0,96$
12	Variable	Saturación	AC	$K_{II} = 3,93 \times 10^{-6} \pm 0,14$
	Saturación	Variable	M	$K_{II} = 2,69 \times 10^{-6} \pm 0,36$
				$K_{IS} = 9,21 \times 10^{-7} \pm 0,70$
13	Variable	Saturación	AC	$K_{II} = 5,38 \times 10^{-7} \pm 0,21$
	Saturación	Variable	M	$K_{II} = 4,78 \times 10^{-7} \pm 0,84$
				$K_{IS} = 1,45 \times 10^{-7} \pm 0,12$
14	Variable	Saturación	AC	$K_{II} = 7,77 \times 10^{-6} \pm 0,54$
	Saturación	Variable	M	$K_{II} = 1,20 \times 10^{-6} \pm 0,17$
				$K_{IS} = 2,31 \times 10^{-7} \pm 0,13$
15	Variable	Saturación	AC	$K_{II} = 1,79 \times 10^{-6} \pm 0,13$
	Saturación	Variable	M	$K_{II} = 4,77 \times 10^{-6} \pm 1,36$
				$K_{IS} = 9,09 \times 10^{-7} \pm 1,07$

AC, Inhibición acompetitiva; NC, no competitiva; M, Mixta.





**Figura 5.** Inhibición de COMT por 3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenzaldehído (5). **A.** La actividad de COMT se midió en función de la concentración de catecol con una concentración de SAM saturante. **B.** Representación de los dobles recíprocos de la velocidad inicial frente a la concentración de SAM, con la concentración de catecol variable. Los recuadros interiores muestran, en ambos casos, la representación de la variación de los cortes en y con la concentración de inhibidor.



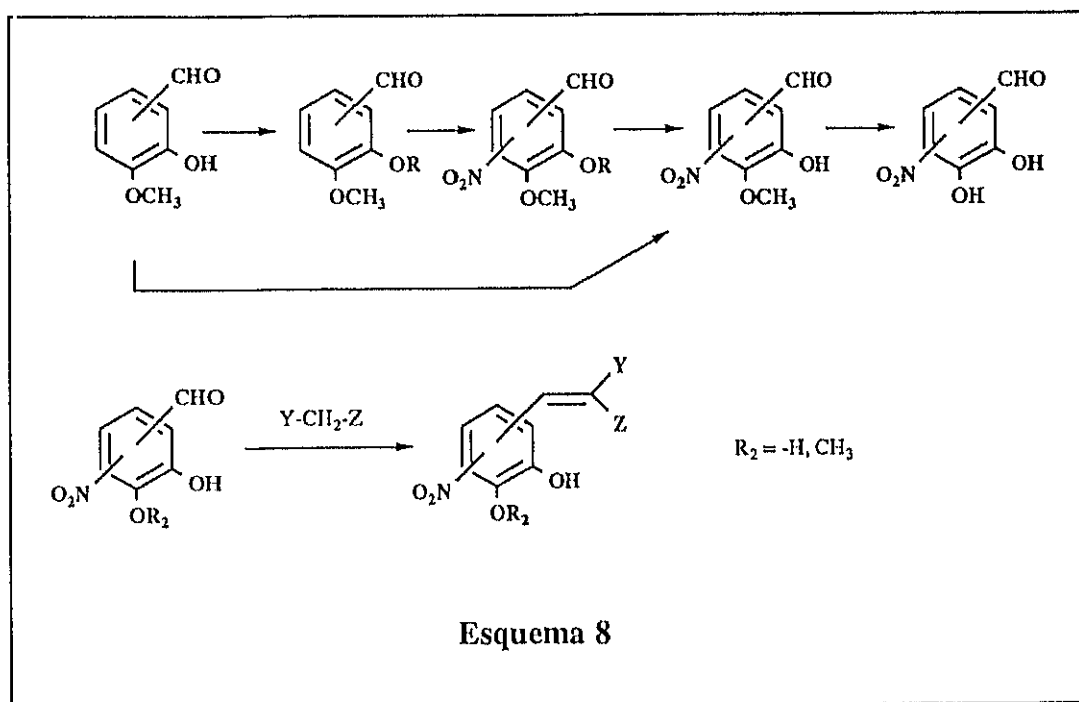
**Figura 6.** Inhibición de COMT por 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (11). A. Representación de Lineweaver-Burk de la velocidad inicial frente a las concentraciones de catecol, con una concentración saturante de SAM. El recuadro interior recoge la variación de la pendiente y del corte en el eje y con la concentración de inhibidor. B. Representación de los dobles recíprocos de la velocidad inicial frente a la concentración de SAM, con la concentración de catecol variable. El recuadro pequeño muestra la variación del corte en y con la concentración de inhibidor.

### **3. SINTESIS DE 1-VINILDERIVADOS DE NITROGUAYACOL Y NITROCATECOL**

Se decidió realizar la síntesis de 1-vinilderivados de nitroguayacol y nitrocatecol debido a que, como es conocido, la presencia de un grupo carboxilo en posición 1 conjugado con el anillo aromático, bien directamente o a través de un doble enlace, aumenta su potencia como inhibidores de COMT<sup>9,10</sup>.

La selección de los productos de partida para la síntesis de estos vinil derivados se realizó en base a los resultados obtenidos con hidroximetoxi y dihidroxinitrobenzaldehídos<sup>125</sup>. Así, en la obtención de vinil derivados de nitroguayacol (análogos del producto de la reacción enzimática), el producto inicial para este proceso es la 5-isovainillina (**5**) por ser éste el único hidroximetoxinitrobenzaldehído que mostró actividad como inhibidor de COMT. Al analizar los resultados cinéticos obtenidos para los dihidroxinitrobenzaldehídos se observó que un grupo nitro en posición *orto* con respecto a uno de los hidroxilos aumentaba la actividad de estos productos como inhibidores de COMT; según esto, el 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído (**10**), 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (**11**) y el 2,3-dihidroxi-4-nitrobenzaldehído (**13**) son los únicos que cumplen este requisito. Se seleccionaron para posteriores modificaciones **10** y **13** debido a que existen antecedente bibliográficos de inhibición de COMT por vinilderivados obtenidos a partir de **11**<sup>9,10</sup>. No obstante, se decidió realizar la síntesis de un derivado de **11** la (3,4-dihidroxi-5-nitrobenciliden)-2,4-pentanodiona (nitecapone, **25**) y estudiar su actividad como inhibidor de COMT, con el fin de comparar los resultados que se obtengan para los vinil derivados, cuya síntesis se recoge en este apartado, con los publicados para productos análogos.

Los vinil derivados de nitroguayacol y nitrocatecol fueron sintetizados por condensación del grupo aldehído del hidroximetoxi o dihidroxinitrobenzaldehído con reactivos que poseen grupos metilos o metilenos activados, tales como pentanodiona, acetofenona, nitroacetato de etilo y ciclopentanona<sup>9</sup>. El esquema 8 muestra el proceso general de síntesis de estos productos.

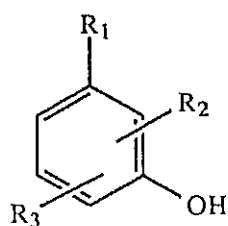


Las reacciones de condensación de este tipo pueden tener lugar en medio ácido o básico. Con el fin de evitar reacciones secundarias indeseables por parte de los grupos hidroxilos, se realizó la síntesis en medio ácido. Las reacciones en general transcurren con facilidad mezclando los reactivos en el disolvente elegido (tetrahidrofurano o metanol) y saturando posteriormente la mezcla con ácido clorhídrico gas<sup>9</sup>. En la tabla 4 se indican las estructuras de los productos sintetizados.

En general, las reacciones de condensación tienen lugar por agitación, a 40°C durante 12 horas, de la mezcla saturada con ácido clorhídrico, excepto en los procesos de condensación con nitroacetato de etilo que tienen lugar a temperatura ambiente y tiempos de reacción más largos.

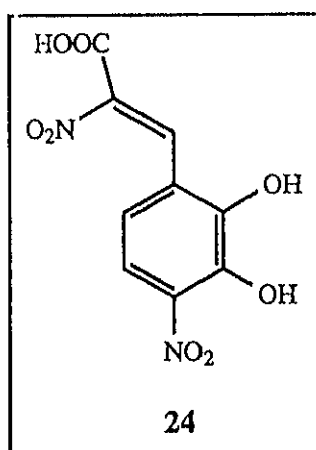
La síntesis de **19**, **22**, y **24** se realizó por condensación del correspondiente derivado de benzaldehído y nitroacetato de etilo, utilizando metanol como disolvente. Durante el proceso se produce la ruptura del grupo éster, al tener lugar un proceso de transesterificación con el disolvente o trazas de agua del mismo; así, en el crudo de reacción se detectan además del ácido, el éster metílico y el etílico. Cuando se intentó la reacción utilizando un disolvente aprótico, como tetrahidrofurano, no pudo aislarse el producto de condensación esperado.

**Tabla 4.** Estructura de los 1-vinilderivados de nitroguayacol y nitrocatecol sintetizados.

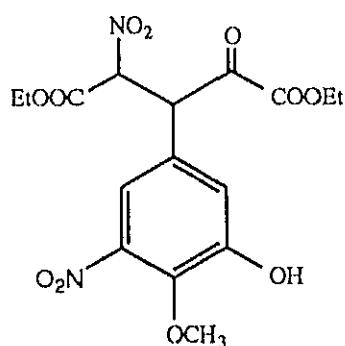
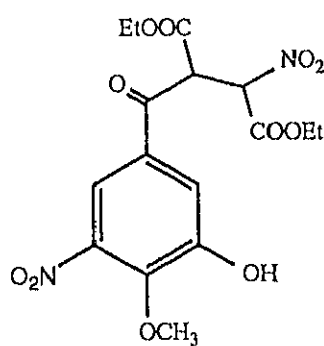


Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
17	-CH=C(COCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>
18	-CH=CHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>
19	-CH=C(NO <sub>2</sub> )COOH	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>
20	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{---} \end{array}$ -CH=CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=CH- -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> -3-OH-4-OCH <sub>3</sub> -5-NO <sub>2</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>
21	-CH=CHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-OH	2-NO <sub>2</sub>
22	-CH=C(NO <sub>2</sub> )COOH	4-OH	2-NO <sub>2</sub>
23	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{---} \end{array}$ -CH=CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=CH- -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> -2,3(OH) <sub>2</sub> -4-NO <sub>2</sub>	4-OH	2-NO <sub>2</sub>
24	-CH=C(NO <sub>2</sub> )COOH	2-OH	4-NO <sub>2</sub>
25	-CH=C(COCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4-OH	5-NO <sub>2</sub>

En la reacción de 2,3-dihidroxi-4-nitrobenzaldehído (13) con nitroacetato de etilo en metanol y medio ácido existía la posibilidad de formación de una lactona que estabilizase el producto final; no obstante, hubo que desestimar esta hipótesis, puesto que al tratar el producto de condensación con diazometano se obtuvo un dimetil derivado. Según esto, la estructura de 24 sería la siguiente,



Con el objeto de evitar las reacciones de transesterificación anteriormente indicadas, se intentó realizar la condensación en medio básico, utilizando dimetilformamida como disolvente y piperidina como base. En estas condiciones, únicamente se observó reacción cuando el derivado de benzaldehído utilizado era el 3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenzaldehído (**5**); sin embargo, el producto obtenido no era el 1-vinil-derivado esperado, sino un compuesto resultante de una doble adición de nitroacetato de etilo al aldehído, con pérdida de un grupo nitro, en una posible reacción tipo Nef (ver después). En nuestro caso, esta reacción puede transcurrir de dos modos distintos, que darían lugar a dos estructuras diferentes **A** y **B**:

**A****B**

26

Con el fin de intentar determinar la estructura del compuesto obtenido, llevamos a cabo un estudio de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN, que nos permitió establecer las siguientes conclusiones:

1) Los desplazamientos químicos de los protones aromáticos H-2 y H-6 (ver tabla 5) se corresponden mejor con los calculados para la estructura **A** que para la **B**.

2) Efectuando cuidadosas medidas en el espectro experimental, pudimos constatar la presencia de constantes de acoplamiento a larga distancia entre uno de los protones alifáticos con los protones aromáticos H-2 y H-6, de magnitudes  $J_{\text{H,H-2}} = 0,4 \text{ Hz}$  y  $J_{\text{H,H-6}} = 0,3 \text{ Hz}$ , más acordes con valores de constantes a 4 enlaces ( $^4J$ ), que a 5 enlaces ( $^5J$ ), lo que apunta de nuevo hacia una estructura tipo **A**.

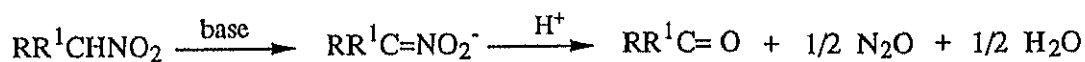
**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de los protones aromáticos H-2 y H-6

	$\delta$ (ppm)	
	H <sub>2</sub>	H <sub>6</sub>
Observados	7,22	7,42
Calculados para A	7,01	7,51
Calculados para B	7,62	8,30

3) Los valores de los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (ver parte experimental) indican la presencia de tres carbonilos distintos; uno hacia 168 ppm, correspondiente a un carbonilo de un grupo éster aislado, y dos más a campo bastante más alto (de aproximadamente 158 y 152 ppm). Estos dos valores se corresponderían mejor con los de carbonilos adyacentes que con los de carbonilos aislados, siendo en nuestro caso muy diferentes por tratarse de un éster uno de ellos y un grupo ceto el que resta. Una vez más, estos datos concuerdan mejor con la estructura A que con la B.

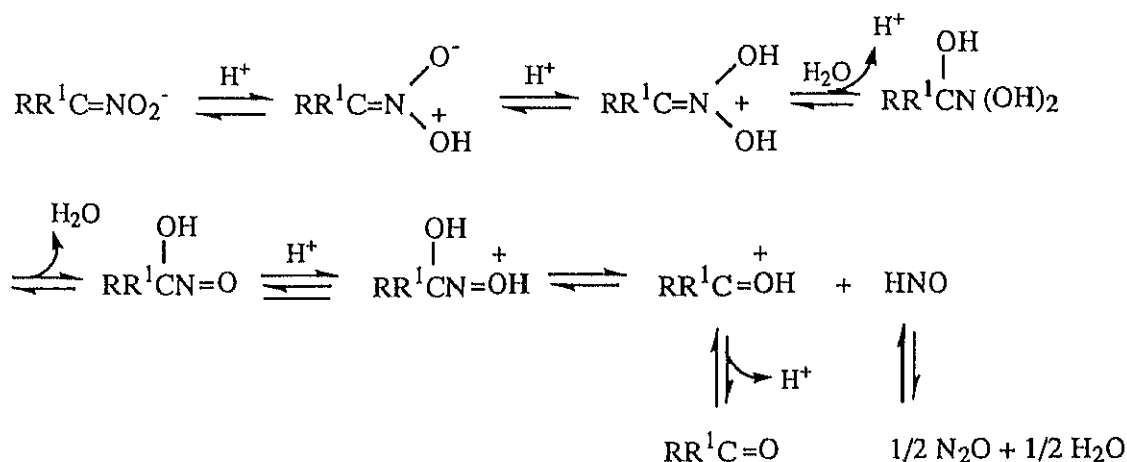
Como el proceso de condensación en medio básico se lleva a cabo con un alto exceso de nitroacetato de etilo, se intentó la reacción en condiciones equimoleculares de los productos a condensar, observándose la formación de **26** y quedando producto sin reaccionar; por tanto, la reacción de condensación doble con nitroacetato de etilo parece estar favorecida.

La transformación de un nitroalcano en un compuesto carbonílico es la denominada reacción de Nef<sup>126</sup>. El esquema de reacción para esta transformación es el siguiente:



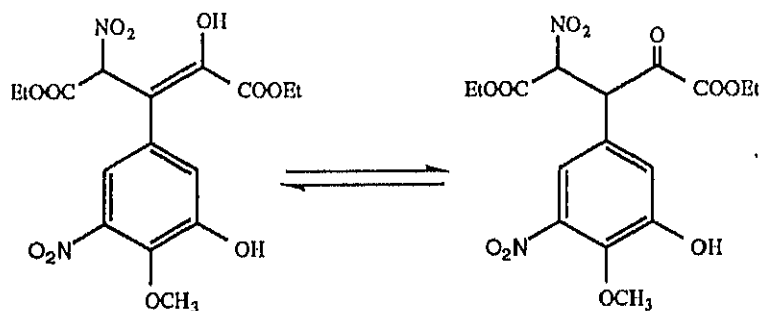
El mecanismo más probable para este proceso se indica a continuación:

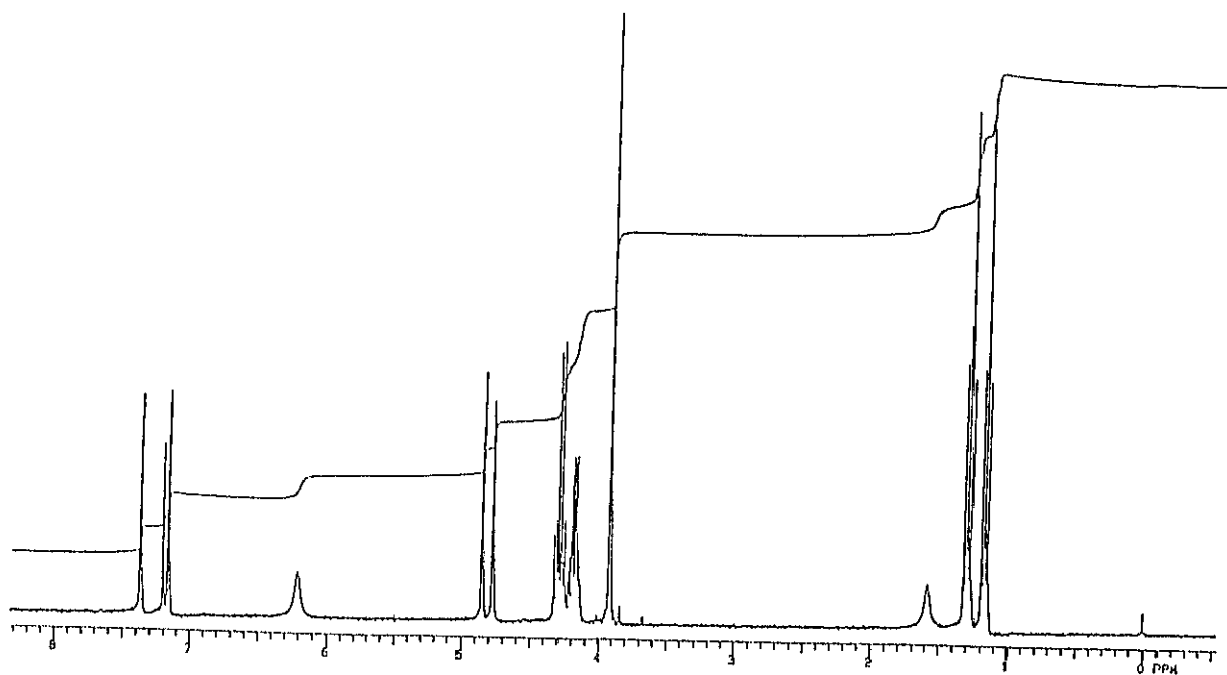




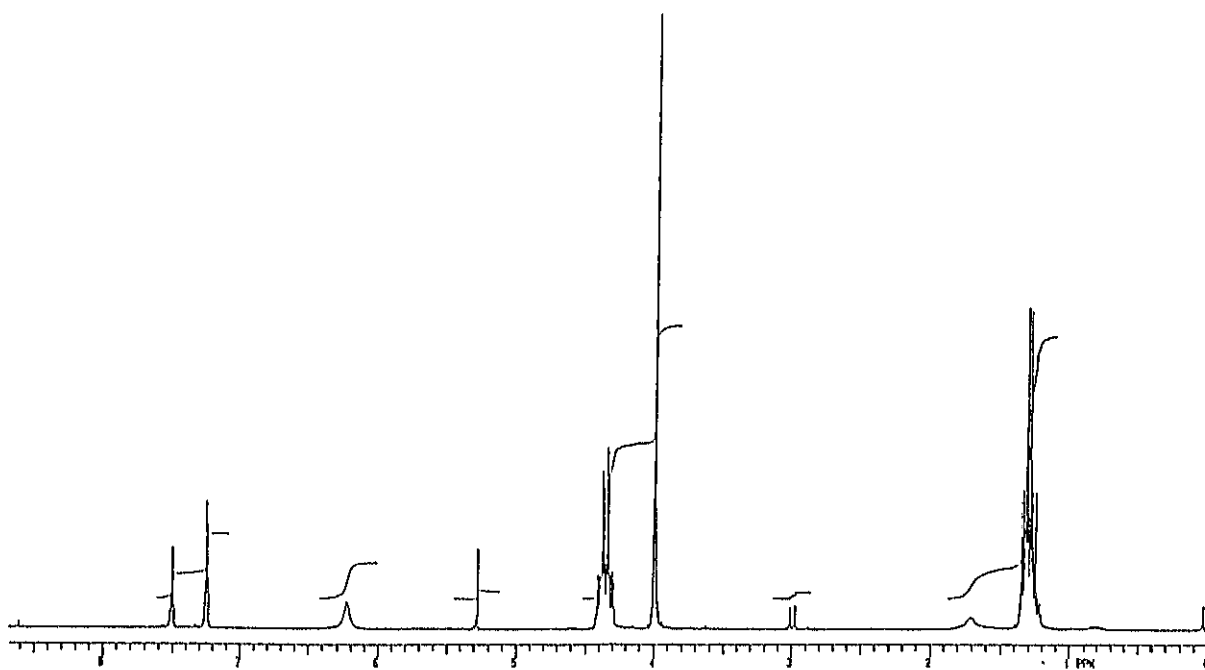
Las estructuras postuladas para el compuesto **26** son el resultado de dos posibles mecanismos de reacción del proceso, en función de cuando tenga lugar la reacción de Nef. Así, una de las estructuras (**26A**) sería el resultado de una primera condensación con nitroacetato de etilo, posterior adición de Michael de otra molécula de nitroacetato de etilo al doble enlace formado y, por último, la transformación de Nef de uno de los grupos nitro presentes; la segunda posibilidad (**26B**) supondría la transformación del grupo nitro en carbonilo tras la condensación con nitroacetato de etilo, llevándose a cabo posteriormente la adición de una nueva molécula de nitroacetato de etilo al grupo carbonilo formado.

Como puede observarse en el mecanismo anteriormente indicado, en el proceso es necesaria la presencia de protones. Cuando una vez terminada la reacción no se lleva a cabo la adición de sulfúrico, ni la filtración en gel de sílice o intentos de recristalización del crudo de reacción (procesos todos ellos en los que el intermedio puede captar protones), en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (espectro 2) no se observa la presencia de un protón en el carbono unido al grupo nitro, ni en el unido al anillo aromático, lo cual hace suponer que el producto presenta un equilibrio tautomérico entre la forma enol y la forma ceto.





Espectro 1



Espectro 2

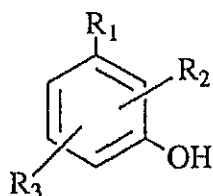
#### **4. INHIBICION DE COMT POR 1-VINILDERIVADOS DE NITROGUAYACOL Y NITROCATECOL**

Los derivados de nitroguayacol y nitrocatecol, sintetizados y descritos en el apartado 3, poseen en posición 1 un grupo vinilo conjugado con el anillo aromático, con el fin de hacer posible la reacción de dicho grupo con algún grupo tiol presente en el centro activo de la enzima o próximo a él.

Los ensayos de inhibición de COMT por estos productos mostraron que todos ellos actuaban como inhibidores enzimáticos. El cálculo de sus valores de IC<sub>50</sub> se llevó a cabo a partir de los resultados de los ensayos sin pre-incubación de la enzima y el inhibidor, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos, en ausencia de DTT.

Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con los 1-vinilderivados de nitroguayacol y nitrocatecol (tabla 6) son similares o menores que los observados para sus aldehídos precursores<sup>125</sup>, con la excepción de la 3-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenziliden)-2,4-pentanediona (**17**); estos resultados están de acuerdo con lo descrito en la literatura para productos análogos<sup>9</sup>. El análisis de los resultados recogidos en la tabla 6 muestra que los valores obtenidos para los bis-aductos **20** y **23** resultan ser 100 veces menores que los de sus precursores, mientras que en los obtenidos para los productos **19**, **22**, y **24** no se observa disminución alguna.

Al igual que ocurría con los derivados de dihidroxibenzaldehído descritos anteriormente<sup>125</sup>, los valores obtenidos para estos productos son más altos que los publicados en la literatura para compuestos análogos<sup>9</sup>. Esto puede deberse nuevamente a la baja afinidad de estos compuestos por la enzima aislada de hígado de cerdo en comparación con la obtenida de otras fuentes<sup>17,122,123</sup>.

**Tabla 6.** Inhibición de COMT por derivados 1-sustituídos de nitrocatecol y nitroguayacol.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> (M)
5	-CHO	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>	3,4 x 10 <sup>-5</sup>
17	-CH=C(COCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>	5,5 x 10 <sup>-5</sup>
18	-CH=CHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>	1,5 x 10 <sup>-5</sup>
19	-CH=C(NO <sub>2</sub> )COOH	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>	1,9 x 10 <sup>-5</sup>
20	$\begin{array}{c} \text{--- CO ---} \\   \\ \text{-CH=CCH}_2\text{CH}_2\text{C=CH-} \\ \text{-C}_6\text{H}_2\text{-3-OH-4-OCH}_3\text{-5-NO}_2 \end{array}$	4-OCH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>	8,0 x 10 <sup>-7</sup>
10	-CHO	4-OH	2-NO <sub>2</sub>	1,5 x 10 <sup>-6</sup>
21	-CH=CHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-OH	2-NO <sub>2</sub>	3,2 x 10 <sup>-7</sup>
22	-CH=C(NO <sub>2</sub> )COOH	4-OH	2-NO <sub>2</sub>	1,1 x 10 <sup>-6</sup>
23	$\begin{array}{c} \text{--- CO ---} \\   \\ \text{-CH=CCH}_2\text{CH}_2\text{C=CH-} \\ \text{-C}_6\text{H}_2\text{-2,3-(OH)}_2\text{-4-NO}_2 \end{array}$	4-OH	2-NO <sub>2</sub>	2,3 x 10 <sup>-7</sup>
13	-CHO	2-OH	4-NO <sub>2</sub>	1,5 x 10 <sup>-6</sup>
24	-CH=C(NO <sub>2</sub> )COOH	2-OH	4-NO <sub>2</sub>	1,1 x 10 <sup>-6</sup>
11	-CHO	4-OH	5-NO <sub>2</sub>	2,0 x 10 <sup>-6</sup>
25	-CH=C(COCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4-OH	5-NO <sub>2</sub>	8,0 x 10 <sup>-7</sup>

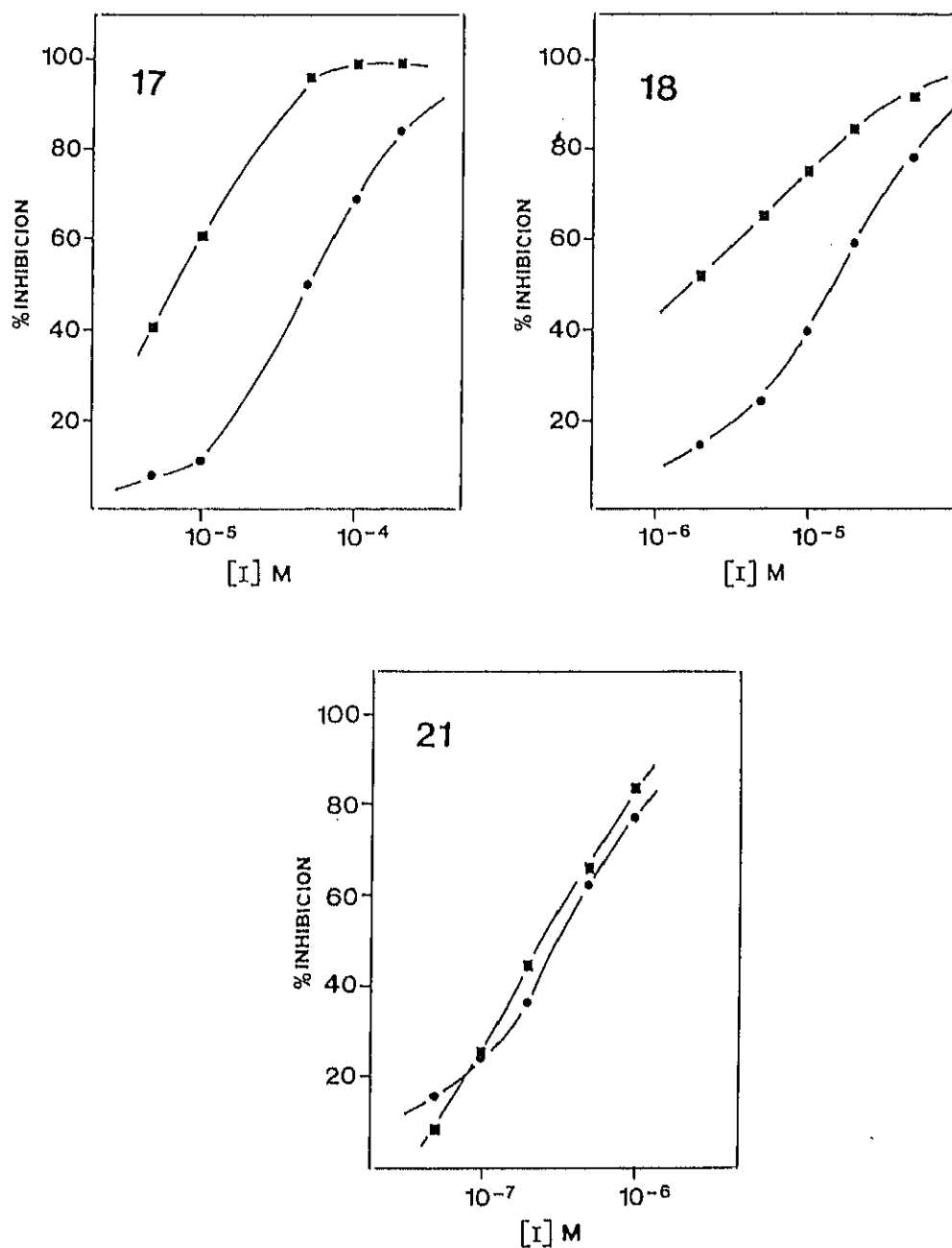
Los valores de IC<sub>50</sub> se calcularon de la representación gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración de inhibidor. Los resultados mostrados son el valor medio de dos experimentos.

En vista de esta diferencia, se decidió sintetizar la 3-(3,4-dihidroxi-5-nitrobenzilo)-2,4-pentanediona (**25**), compuesto ampliamente estudiado como inhibidor de COMT, y realizar un estudio de la inhibición que presenta frente a COMT aislada de hígado de cerdo, siguiendo las mismas condiciones de ensayo que para el resto de los productos recogidos en la tabla 6. En estas condiciones, el producto **25** presenta un valor de  $IC_{50}$  de 800 nM, 40 veces mayor que el valor dado en la bibliografía cuando se utiliza COMT aislada de cerebro de rata y ácido 3,4-dihidroxibenzoico como sustrato aceptor de metilos ( $IC_{50} = 18\text{nM}$ )<sup>9</sup>.

La presencia de sustitución en posición 1 por un grupo vinilo activado iba dirigida a la obtención de inhibidores irreversibles de COMT. En primer lugar, se realizó un ensayo de inhibición enzimática con pre-incubación de los compuestos con la enzima durante 15 min a 37 °C; sorprendentemente, los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que, en la mayoría de los compuestos estudiados, la inhibición enzimática no dependía del tiempo de pre-incubación del inhibidor y la enzima, sugiriendo por tanto una inhibición de tipo reversible. Para confirmar esto, se realizó un ensayo de dilución de la mezcla pre-incubada de enzima e inhibidor, confirmándose el comportamiento reversible de todos los productos salvo los compuestos **17** y **18** que, aparentemente, actuaban como inhibidores irreversibles. Como ejemplo del ensayo de dilución realizado, en la figura 7 se muestran los resultados obtenidos con tres de los productos estudiados.

Para confirmar que efectivamente **17** y **18** inhiben COMT de forma irreversible, se llevaron a cabo ensayos adicionales de diálisis o filtración en gel de una mezcla pre-incubada de la enzima y el inhibidor. Durante el proceso de diálisis se observó una pérdida casi total de la actividad enzimática. Por lo tanto, para poder definir estos productos como inhibidores irreversibles se realizó la medida de actividad de una mezcla pre-incubada, antes y después de filtración a través de una columna de Sephadex G25, observándose que tras el proceso de filtración seguía manteniéndose la inhibición de COMT producida por **17**, mientras que con el compuesto **18** tenía lugar una recuperación parcial de la actividad enzimática. Estos resultados sugieren que el compuesto **17** es un inhibidor irreversible de COMT, mientras que **18** parece actuar como un inhibidor reversible de disociación lenta.

De los compuestos sintetizados se seleccionaron dos para realizar el estudio de la cinética de inhibición de COMT por estos productos. Los inhibidores seleccionados fueron **17**, por tratarse del único compuesto que actuaba como inhibidor irreversible de la enzima, y como inhibidor reversible fue seleccionado el compuesto **21**.



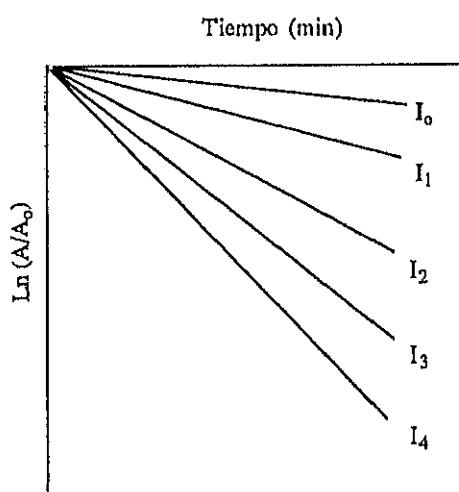
**Figura 7.** Inhibición de COMT en función de la concentración de los compuestos 17, 18 y 21. La inhibición de COMT se determinó a diferentes concentraciones de inhibidor sin pre-incubación (●) o con pre-incubación durante 1 hora a 37 °C de una mezcla 62 veces más concentrada de enzima e inhibidor (■). Los valores representados son el valor medio de dos determinaciones.

#### 4.1. INHIBICION DE COMT POR (3-HIDROXI-4-METOXI-5-NITRO BENCILIDEN)-2,4-PENTANODIONA (17)

Como se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos en los ensayos de dilución y filtración en gel indican que **17** inhibe COMT de manera irreversible. Antes de comentar en detalle la cinética de inhibición irreversible de COMT por la 3-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)-2,4-pentanodiona (**17**) se describirán someramente los tipos de inhibición irreversible.

##### 4.1.1. *Inhibición irreversible*

Un inhibidor irreversible es aquél que se une a la enzima mediante una reacción irreversible; es decir, en el proceso tiene lugar la formación de un enlace covalente entre el inhibidor y algún grupo funcional de la enzima. En este caso, la actividad enzimática no puede recuperarse por los métodos habituales de dilución, diálisis o filtración en gel.



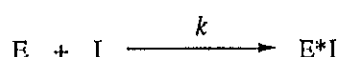
Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de pre-incubación de la enzima y distintas concentraciones del inhibidor



Asimismo, una inhibición irreversible se caracteriza por un aumento progresivo de la misma con el tiempo de pre-incubación de la enzima con el inhibidor. Esta propiedad (de la inactivación enzimática con el tiempo) se pone de manifiesto al representar gráficamente el logaritmo de la actividad residual frente al tiempo; la pendiente de las rectas obtenidas permiten el cálculo de la constante de velocidad aparente.

El inhibidor irreversible puede unirse a la enzima de dos maneras diferentes:

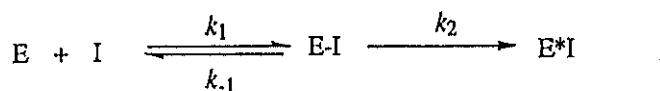
a. Siguiendo un mecanismo inespecífico o al azar.



$E^*I$  representa el complejo covalente

En un mecanismo de este tipo, y a una concentración de inhibidor mucho mayor que la de enzima, la constante de velocidad aparente ( $k_{app}$ ) es el valor de la pendiente que se obtiene al representar el logaritmo de la actividad enzimática residual en función del tiempo de incubación, a una concentración constante de inhibidor. La representación gráfica de los valores de  $k_{app}$  frente a distintas concentraciones de inhibidor da una línea recta que pasa por el origen, de cuya pendiente se obtiene el valor de  $k$ , de acuerdo con la relación  $k_{app} = k[I]$ .

b. Siguiendo un mecanismo específico, en el cual el inhibidor forma en primer lugar un complejo reversible con la enzima para reaccionar después covalentemente con algún grupo funcional esencial para la actividad enzimática.



Al igual que en el caso anterior, la constante de velocidad aparente se obtiene de la pendiente de la recta que resulta al representar el logaritmo de la actividad residual frente al tiempo de incubación. Si la concentración de inhibidor es mucho mayor que la de enzima, manteniéndose prácticamente constante durante el proceso, y  $k_2$  es bastante menor que  $k_{-1}$ , la primera parte de la reacción estará en equilibrio y al representar  $k_{app}$  frente a la concentración de inhibidor se observará una curva de saturación. En este caso, los valores de las constantes cinéticas pueden calcularse de la representación gráfica del inverso de la constante aparente

frente al inverso de la concentración de inhibidor, ya que la relación de ambos factores puede expresarse de forma inversa según la ecuación<sup>127</sup>:

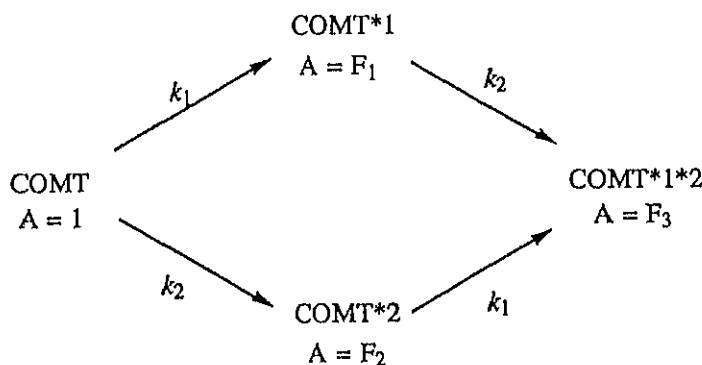
$$\frac{1}{K_{app}} = \frac{K_I}{k_2[I]} + \frac{1}{k_2}$$

donde  $K_I = k_{-1}/k_1$ . La pendiente de la recta es  $K_I/k_2$  y el corte en el eje de ordenadas  $1/k_2$ .

#### 4.1.2. Cinética de la inhibición irreversible de COMT por 17.

Con el fin de estudiar el mecanismo de inactivación irreversible de COMT por 17, la enzima fue pre-incubada con el inhibidor, en ausencia de DTT, determinando la actividad residual a distintos tiempos de incubación y tras diluir 25 veces la mezcla de incubación. En la figura 8 se muestra la inhibición de COMT en función del tiempo de pre-incubación en presencia de diferentes concentraciones de 17. Cuando se representa el logaritmo del valor neto de la actividad residual frente al tiempo de pre-incubación se observa una cinética bifásica<sup>128</sup>; de manera análoga a lo observado con derivados de maleimida<sup>17</sup>.

De acuerdo con Ray y Koshland<sup>129</sup>, este comportamiento bifásico sugiere la reacción de 17 con dos o más grupos de la proteína que son esenciales para la actividad enzimática. También es posible que este comportamiento sea debido a la modificación de residuos esenciales de diferentes formas de COMT que puedan estar presentes en la preparación enzimática obtenida de hígado de cerdo, al igual que ocurre con la enzima aislada de hígado de rata<sup>130</sup>. Si consideramos que lo que tiene lugar es la reacción del inhibidor con dos grupos esenciales de COMT, los cuales presentan distinta reactividad frente a 17, el mecanismo del proceso sería el siguiente:



donde  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$  representan la actividad enzimática parcial después de la modificación de los grupos 1 y 2 o de ambos, respecto de la enzima no modificada.  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de primer orden para la modificación de los grupos 1 y 2 respectivamente. Este mecanismo de inactivación responde a la ecuación

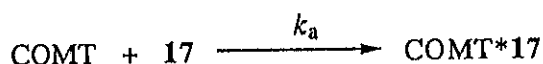
$$\frac{A}{A_0} = F_3 + (1 - F_1 - F_2 + F_3) e^{-(k_1 + k_2)t} + (F_1 - F_3) e^{-k_2 t} + (F_2 - F_3) e^{-k_1 t}$$

la cual puede simplificarse si se considera que  $F_2 = F_3 = 0$ . En este caso,  $F = F_1$  sería la fracción de actividad que queda una vez modificado el grupo 1.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - F) e^{-(k_1 + k_2)t} + F e^{-k_2 t}$$

siendo  $A$  la actividad residual a tiempo  $t$  y  $A_0$  la actividad cuando no ha tenido lugar pre-incubación.

Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  se determinaron previamente de acuerdo con el método gráfico de Borchardt y Thakker<sup>98</sup> y fueron calculados posteriormente utilizando un programa de análisis de regresión no lineal (tabla 7). Mediante la representación gráfica de los valores de  $k_1$  frente a la concentración de inhibidor se obtiene una línea recta con un corte en el eje  $x$  (ver figura 9A). Este resultado parece indicar que el grupo más reactivo es modificado siguiendo un mecanismo no específico<sup>128</sup>, donde  $k_a$  representa la constante de velocidad de inactivación del grupo 1. La constante de velocidad de primer orden viene dada por  $k_1 = k_a[I]$ ; según esto,  $k_a$  sería el valor de la pendiente de la recta obtenida al representar  $k_1$  frente a la concentración de inhibidor. El corte positivo en el eje  $x$  puede deberse a la reacción de **17** con otros grupos SH presentes en COMT, que no son esenciales para la actividad enzimática, o con otras proteínas contaminantes de la preparación enzimática capaces de reaccionar con **17**.



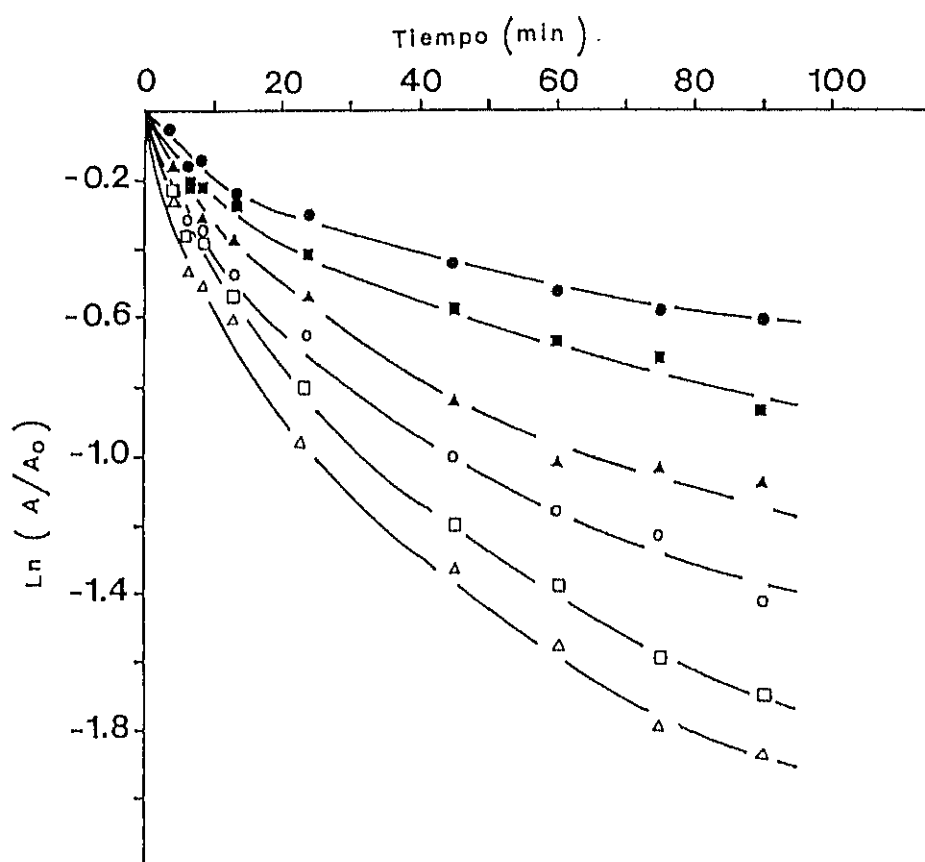
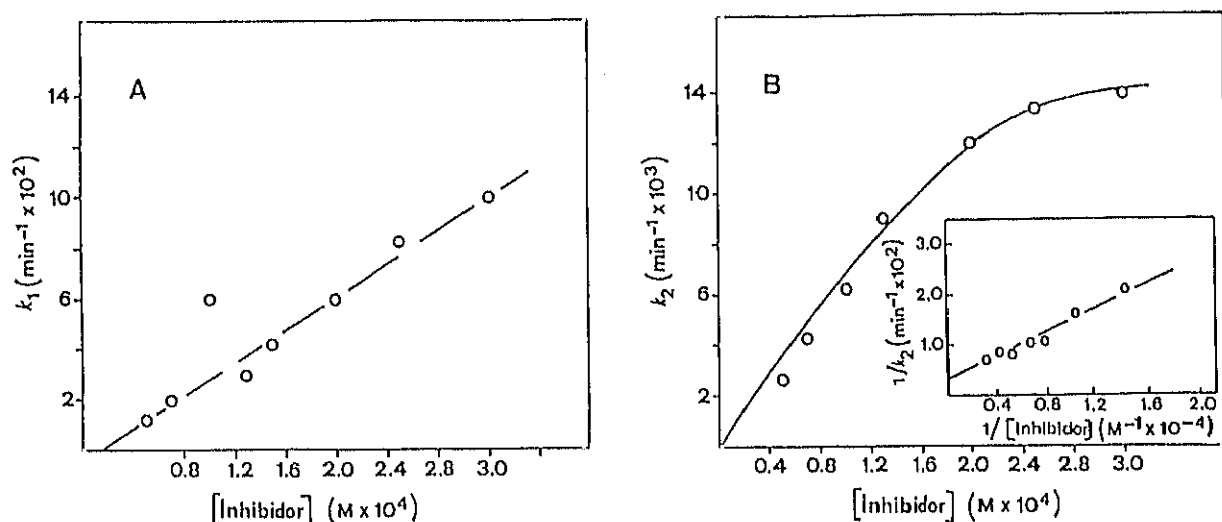


Figura 8. Inactivación de COMT por el compuesto 17 en función del tiempo de incubación. La enzima es incubada a 37 °C en tampón fosfato pH 7,6 con diferentes concentraciones de 17: (●) 0,07 mM; (■) 0,10 mM; (▲) 0,15 mM; (○) 0,20 mM; (□) 0,25 mM; (△) 0,30 mM.

Por otro lado, cuando se hace la representación gráfica de los valores de  $k_2$  frente a la concentración de inhibidor, se observa una cinética de saturación (ver figura 9B), que parece indicar que 17 modifica el grupo menos reactivo a través de la formación de un complejo intermedio reversible<sup>128</sup>:



donde  $k_b$  representa la constante de velocidad de primer orden para el proceso irreversible.



**Figura 9.** Análisis de las constantes de velocidad de primer orden para la modificación de los residuos 1 y 2 en función de la concentración de 17. A. Representación gráfica de  $k_1$  frente a la concentración de 17;  $k_a$  es el valor de la pendiente de la recta. B. Gráfica de  $k_2$  frente a la concentración de inhibidor. En el interior se muestra la representación de Lineweaver-Burk para el cálculo de  $k_b$  y  $K_I$  a partir del corte en el eje de ordenadas y el valor de la pendiente de la recta respectivamente.

**Tabla 7.** Inhibición irreversible de COMT por el compuesto 17. Análisis de los dos grupos reactivos.

Grupo modificado	Mecanismo de Inhibición	Constante de Inhibición $\pm$ E.E.
1	No específico	$k_a = 5,57 \pm 0,34 \text{ M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$
2	específico	$K_I = 4,73 \times 10^{-4} \pm 0,67 \text{ M}$ $k_b = 5,78 \times 10^{-4} \pm 0,58 \text{ seg}^{-1}$ $k_b/K_I = 1,22 \text{ M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$

$k_b/K_I$  valor estimado de la constante global de velocidad para las etapas reversibles e irreversibles en un mecanismo específico, con el fin de comparar con la constante de velocidad observada en el proceso no específico. Estos datos son el valor medio de cuatro experimentos.

Los resultados obtenidos para la modificación de ambos grupos reactivos por **17** y los obtenidos en nuestro grupo con una serie de N-(4-hidroxí-3-metoxifenilalquil)maleimidás<sup>17</sup> fueron diferentes. Así, en el caso de los derivados de maleimida se observó que el grupo más reactivo era modificado específicamente o no dependiendo de la distancia y de la orientación relativa del anillo aromático y el grupo reactivo del inhibidor, y que la modificación del grupo menos reactivo en todos los casos tenía lugar de forma no específica<sup>17</sup>; mientras que con **17** ocurre al contrario (ver tabla 7). Por otra parte, la reactividad del anillo de maleimida frente a grupos SH esenciales de COMT, medida en función de la constante de velocidad de la modificación, es mucho mayor que la reactividad observada para **17**. Este hecho puede ser debido a las diferentes propiedades intrínsecas que presentan los grupos vinilo, a partir de los cuales tiene lugar la unión con los grupos tiol en el caso de las maleimidás y en el del compuesto **17**.

La diferencia en la reactividad de los dos grupos sulfhidrilo con los derivados de maleimida y el compuesto **17** es difícil de explicar. No obstante, esta diferencia podría deberse a que si estos inhibidores son considerados análogos del producto de la reacción enzimática, las maleimidás estudiadas serían análogos de los productos resultantes de la metilación en 3, mientras que el compuesto **17** sería un análogo de los productos metilados en 4; y por tanto, es probable que estos compuestos al unirse a la enzima sitúen el doble enlace reactivo con una orientación espacial relativa diferente.

#### 4.1.3. *Reacción del compuesto 17 con DTT e inhibición reversible de COMT por el complejo DTT-17.*

La alta reactividad de **17** frente a grupos tiol se manifiesta en el hecho de que este compuesto reacciona instantáneamente y de forma cuantitativa con DTT, tal como se observa por cromatografía en capa fina, para dar un aducto estable DTT-**17** cuya estructura pudo ser establecida posteriormente por resonancia magnética nuclear de protón.

La inhibición de COMT por **17** se ha estudiado en presencia de un gran exceso de DTT (2,5 mM) frente a la concentración de inhibidor, con lo cual es de esperar que todo el producto esté formando el aducto con DTT, DTT-**17**, el cual actúa como inhibidor reversible de la enzima<sup>17</sup>.

Cuando se realiza el estudio cinético de inhibición de COMT por este producto<sup>128</sup>, se observa una inhibición mixta frente a concentraciones variables del sustrato catecol ( $K_{IS} = 5,32 \times 10^{-5} \pm 0,92$  M;  $K_{II} = 2,27 \times 10^{-5} \pm 0,23$  M) y acompetitiva cuando el sustrato variable es SAM ( $K_{II} = 1,79 \times 10^{-5} \pm 0,09$  M), mientras que la cinética obtenida para el aldehído precursor **5** es competitiva frente al sustrato catecol y acompetitiva frente a SAM<sup>125</sup> (ver tabla 3).

Este ensayo de inhibición reversible permite confirmar que la presencia de DTT en el ensayo de actividad enzimática protege a la enzima de su inhibición irreversible por **17**, y al mismo tiempo permite establecer que este compuesto **17** necesita el grupo vinilo, capaz de reaccionar con grupos SH, para inhibir la enzima irreversiblemente.

#### 4.1.4. Estudios de protección por sustratos.

Los estudios de protección por sustratos de la inactivación de COMT por el compuesto **17**, se realizaron con el fin de elucidar la naturaleza de la interacción que tiene lugar entre el inhibidor y el centro activo de la enzima. Así, si el grupo modificado por un inhibidor irreversible se encuentra situado en el centro activo de la enzima, la presencia del sustrato o de un inhibidor competitivo con el sustrato protegerá la enzima frente a la inactivación por dicho inhibidor, disminuyendo por tanto la constante de velocidad aparente de pseudo-primer orden de la reacción.

##### - Protección de COMT por SAM

Cuando se incuba COMT con el producto **17**, en presencia de una concentración saturante de SAM, se observa una inactivación de pseudo-primer orden (figura 10), lineal con el tiempo de incubación, con una pendiente ( $k_{app} = 0,78 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) menor que la obtenida cuando se estudia la modificación de los grupos tiol 1 y 2 en ausencia de este sustrato en la mezcla de preincubación ( $k_1 = 1,1 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $k_2 = 5,8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ). Este resultado sugiere que **17** modifica sólo un grupo reactivo de COMT, cuando SAM está presente en la mezcla de pre-incubación; modificación que tiene lugar con una constante de velocidad menor que en ausencia de SAM en la mezcla pre-incubada.

Los iones  $Mg^{+2}$  no parecen afectar la protección de COMT por SAM, al igual que se observó en los estudios de protección de la inactivación de COMT por derivados de maleimida que actuaban de modo inespecífico, como la N-etilmaleimida. Sin embargo, cuando el inhibidor actuaba de forma específica se observaba que el  $Mg^{+2}$  potenciaba notablemente la protección de la enzima por SAM frente a la maleimida<sup>17</sup>. Los resultados obtenidos para la protección por SAM en presencia y en ausencia de ion magnésio se recogen en la tabla 8.

La total protección de la inactivación por **17** de uno de los grupo SH de COMT, probablemente el grupo 2, cuando la enzima se incubaba en presencia de SAM sugiere que este grupo se encuentra localizado en el centro de unión de SAM a la enzima o próximo a él<sup>128</sup>.

**Tabla 8.** Protección de COMT frente a la inactivación por el compuesto **17**.

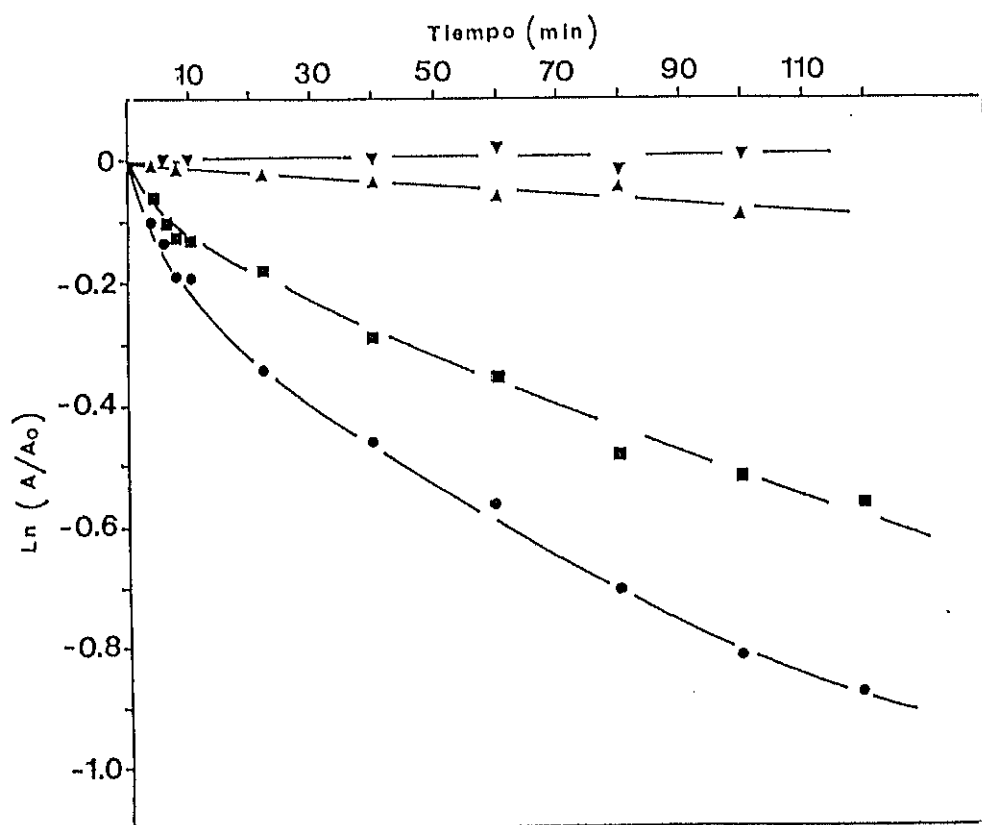
SAM (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Actividad residual (%) $\pm$ E.E.
--	--	14,70 $\pm$ 1,14
--	0,2	11,79 $\pm$ 2,33
0,01	--	21,51 $\pm$ 0,40
0,20	--	40,90 $\pm$ 1,48
0,01	0,2	23,98 $\pm$ 2,16
0,20	0,2	34,24 $\pm$ 4,01

La incubación de COMT a 37 °C durante 2h se realizó con una concentración de inhibidor 0,135 mM en presencia o en ausencia de distintas concentraciones de SAM y/o MgCl<sub>2</sub>. La actividad residual fué calculada con respecto a la actividad observada sin preincubación. Los resultados indicados son el valor medio de cuatro experimentos independientes.



## Protección de COMT por un inhibidor competitivo

El 3,5-dinitrocatecol (DNC) es un inhibidor enzimático muy potente, competitivo con el sustrato catecol ( $K_I = 30,8 \text{ nM}$ ). Debido a la baja afinidad del catecol por la enzima, ya comentada en otras ocasiones, el DNC puede ser utilizado para los estudios de protección enzimática<sup>17</sup>. Así, cuando se realiza el ensayo en presencia de DNC se observa que tiene lugar una cierta protección. El análisis independiente de  $k_1$  y  $k_2$  muestra que se ha producido un ligero incremento en el valor de  $k_1$  ( $0,15 \text{ min}^{-1}$ , en contraste con  $0,1 \text{ min}^{-1}$  en ausencia de DNC); mientras que la modificación del grupo específico por el compuesto 17 era protegida parcialmente en presencia del inhibidor competitivo<sup>128</sup> ( $k_2 = 3,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  con DNC, y  $5,8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  en ausencia de este sustrato en la mezcla de pre-incubación). Asimismo, la presencia de iones magnesio no afecta a los resultados obtenidos.



**Figura 10.** Inactivación de COMT por el compuesto 17 en presencia de SAM, DNC o de ambos. La enzima es pre-incubada con  $0,135 \text{ mM}$  de 17 solo (●) o en presencia de:  $1,5 \text{ μM}$  DNC (■);  $2,5 \text{ mM}$  SAM (▲) o  $1,5 \text{ μM}$  DNC junto con  $2 \text{ mM}$  SAM (▼).

Por último, cuando la enzima es incubada con **17** en presencia de SAM y DNC (figura 10), tanto en presencia como en ausencia de  $Mg^{+2}$ , no se observa inactivación de COMT; este hecho sugiere que ambos grupos modificados (1 y 2) se encuentran localizados en el centro activo de la enzima o próximos a él.

Los resultados obtenidos en los estudios de protección del centro activo de COMT por sustratos parecen indicar que el compuesto **17** "abre" el centro activo de la enzima de forma que el grupo 1 sea más fácilmente accesible al inhibidor mientras que protege ligeramente al grupo 2. La presencia de SAM y DNC bloquean completamente el acceso del inhibidor al centro activo de COMT. Resultados similares fueron obtenidos con N-(4-hidroxi-3-metoxifenilalquil) maleimidasa<sup>17</sup>, y probablemente en ambos casos tenga lugar la modificación de los mismos grupos.

Un posible modelo del centro activo de COMT tendría el grupo 2 localizado cerca del sitio de unión de SAM a la enzima y el grupo 1 localizado cerca del sitio de unión del sustrato catecol o del producto guayacol. De acuerdo con esto, el compuesto **17** podría reaccionar de forma específica con el grupo 2 después de tener lugar la formación de un complejo reversible con la enzima, al situarse **17** en el denominado sitio guayacol. Una vez formado el complejo reversible, el doble enlace de **17** no puede reaccionar con el grupo 1; por tanto, la reacción con este grupo únicamente es posible a través de un mecanismo no específico, en el cual no tiene lugar la formación de un complejo reversible intermedio.

## 4.2. INHIBICION DE COMT POR [2-(3,4-DIHIDROXI-2-NITROFENIL) VINIL]-FENIL CETONA (21)

Los estudios de inhibición de COMT realizados con la [2-(3,4-dihidroxi-2-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (21) mostraron que este producto tiene gran afinidad por la enzima y que actúa como un inhibidor de tipo "tight-binding".

### 4.2.1. Inhibición enzimática de tipo "tight-binding"

Un inhibidor "tight-binding" es un inhibidor reversible lentamente disociable, independientemente del valor de la constante de disociación que tenga, aunque normalmente estos productos se caracterizan por tener bajas constantes de disociación de los complejos enzima-inhibidor<sup>131</sup>. Al no existir un término corto en castellano capaz de definir este tipo de productos, en adelante utilizaremos el término "tight-binding" para referirnos a inhibidores con estas características.

A diferencia de lo que ocurre con un inhibidor reversible clásico, que en una reacción enzimática produce inhibición sólo a concentraciones muy superiores a la concentración de enzima, un inhibidor "tight-binding" puede presentar inhibición reversible a una concentración comparable a la de la enzima. La descripción de un comportamiento de este tipo no puede hacerse basándose en la ecuación de Michaelis-Menten, por no ser válida la suposición de que la concentración de inhibidor libre es prácticamente igual a la concentración total de inhibidor, puesto que una cantidad significativa de éste se encuentra formando un complejo con la enzima.

Hasta el momento, existen en la bibliografía pocos estudios dirigidos a definir las constantes cinéticas de los procesos de inhibición enzimática de este tipo de inhibidores, debido a la complejidad de los mismos. Easson y Stedman<sup>132</sup> fueron los primeros en describir una inhibición de este tipo, si bien presentaron unas ecuaciones cinéticas que consideraban la desaparición del inhibidor en forma libre dichas ecuaciones no tenían en cuenta la influencia del

sustrato en la inhibición. Posteriormente, otros autores estudiaron la cinética de inhibición de enzimas por inhibidores de tipo "tight-binding", aunque únicamente en reacciones monosustrato<sup>133-136</sup>; hasta que en 1969 Morrison<sup>137</sup> describió una ecuación general de velocidad en estado estacionario para reacciones multisustrato en presencia de un inhibidor de este tipo. Asimismo, Morrison mostró que las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk para estos inhibidores no son lineales. Esta falta de linealidad hace que el análisis de los datos cinéticos por métodos convencionales sea muy complicado. Para facilitar este análisis, Henderson<sup>138</sup> desarrolló una ecuación lineal, a partir de la ecuación de Morrison, que describe la cinética de enzimas que interaccionan con este tipo de compuestos; asimismo, los estudios realizados por Cha<sup>139</sup> sobre la cinética de los inhibidores "tight-binding" permiten realizar el cálculo de las constantes aparentes de inhibición mediante la representación de los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con distintas concentraciones de enzima frente a las concentraciones enzimáticas empleadas en cada caso.

Aunque la obtención de gráficas no lineales en la representación de Lineweaver-Burk puede ser indicativo de una inhibición de tipo "tight-binding", Ackermann y Potter<sup>135</sup> descubrieron un método válido para detectar un inhibidor de este tipo mediante la representación gráfica de la velocidad de reacción frente a la concentración enzimática a diferentes concentraciones de inhibidor.

#### 4.2.2. Cinética de la inhibición "tight-binding" de COMT por **21**.

La [2-(3,4-dihidroxi-2-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (**21**) es un inhibidor reversible de COMT de hígado de cerdo con un valor de IC<sub>50</sub> de 0,32  $\mu$ M<sup>128</sup>; este valor, al igual que en casos anteriores, resultó ser más bajo que el descrito en la literatura para compuestos con estructuras análogas. Con este producto se llevó a cabo un estudio completo de la cinética de inhibición de COMT. Con el fin de comparar los resultados obtenidos con **21** con los presentados en la bibliografía para estructuras similares<sup>140</sup>, se realizó un estudio paralelo de la cinética de inhibición de COMT por la 3-(3,4-dihidroxi-5-nitrobenziliden)-2,4-pentanodiona (nitecapone, **25**) utilizando las mismas condiciones de ensayo que con el producto **21**.

Así, cuando el producto **21** y el nitecapone se ensayan con o sin pre-incubación con COMT durante 15 min a 37 °C, no se detecta dependencia de la actividad con el tiempo, lo cual sugiere que se trata de inhibidores reversibles de la enzima. La reversibilidad del proceso fué

confirmada mediante ensayos de dilución. No obstante, cuando se mide la actividad residual después de filtración a través de Sephadex G25 de una mezcla pre-incubada, no se observa una recuperación total de la actividad enzimática, aunque el porcentaje de inhibición desciende un 30% respecto al inicial. Este último resultado indica que, aunque estos compuestos actúan como inhibidores reversibles de COMT, su disociación de la enzima es relativamente lenta.

En primer lugar se estudió la inhibición de COMT por **21** y **25** en función de la concentración de catecol. La representación gráfica del inverso de la velocidad frente al inverso de la concentración de sustrato conduce en ambos casos a representaciones no lineales, tal como se muestra en la figura 11. De acuerdo con Morrison<sup>137</sup>, este resultado sugiere que ambos compuestos actúan como inhibidores "tight-binding" de COMT.

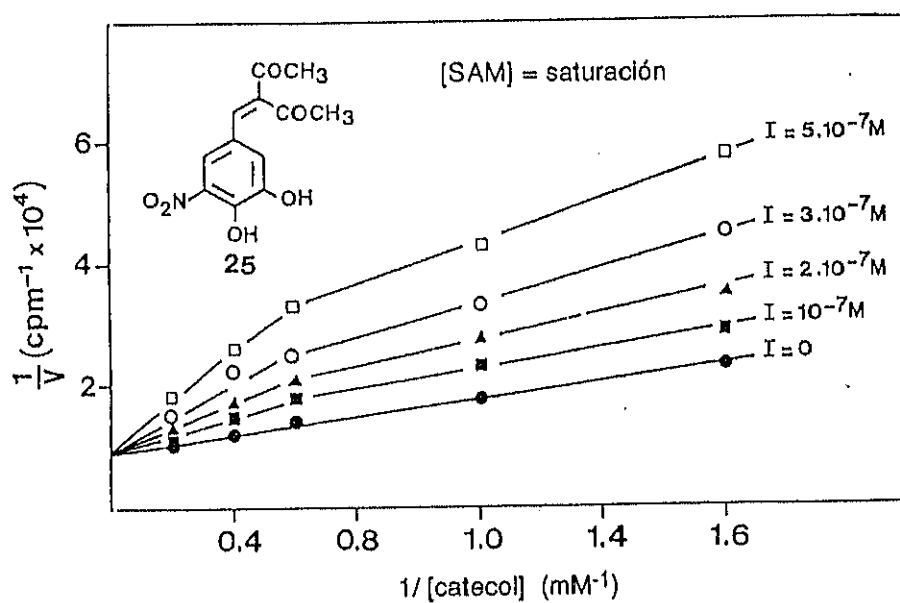
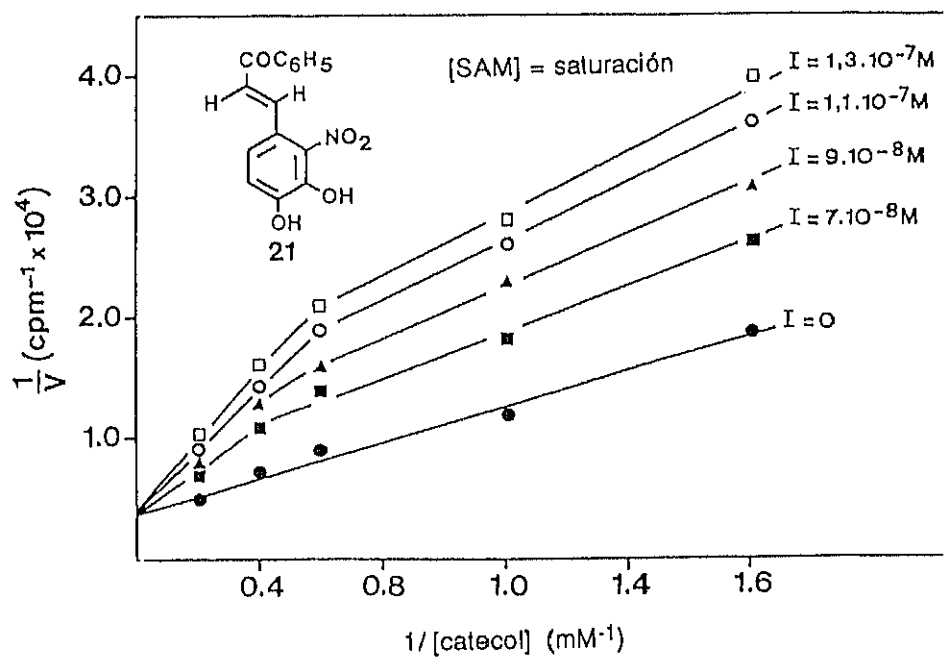
Como ya se ha indicado anteriormente, la representación gráfica de la velocidad frente a la concentración total de enzima (representación de Ackermann-Potter)<sup>135</sup> es el procedimiento utilizado para demostrar la naturaleza "tight-binding" del proceso. Para ello, se lleva a cabo la pre-incubación de diferentes cantidades de enzima con inhibidor, durante 3 horas a 37 °C, y con muestras alícuotas de la mezcla pre-incubada se realizan ensayos de la actividad enzimática a saturación de catecol.

La representación gráfica de los resultados obtenidos a distintas concentraciones de inhibidor en la mezcla de pre-incubación (figura 12) muestra curvas de velocidad paralelas a la del control sin inhibidor para las concentraciones de enzima más altas; este resultado confirma una inhibición de COMT "tight-binding" por los compuestos **21** y **25**.

Las curvas obtenidas en dicha representación tienen una asíntota descrita por la ecuación<sup>139</sup>

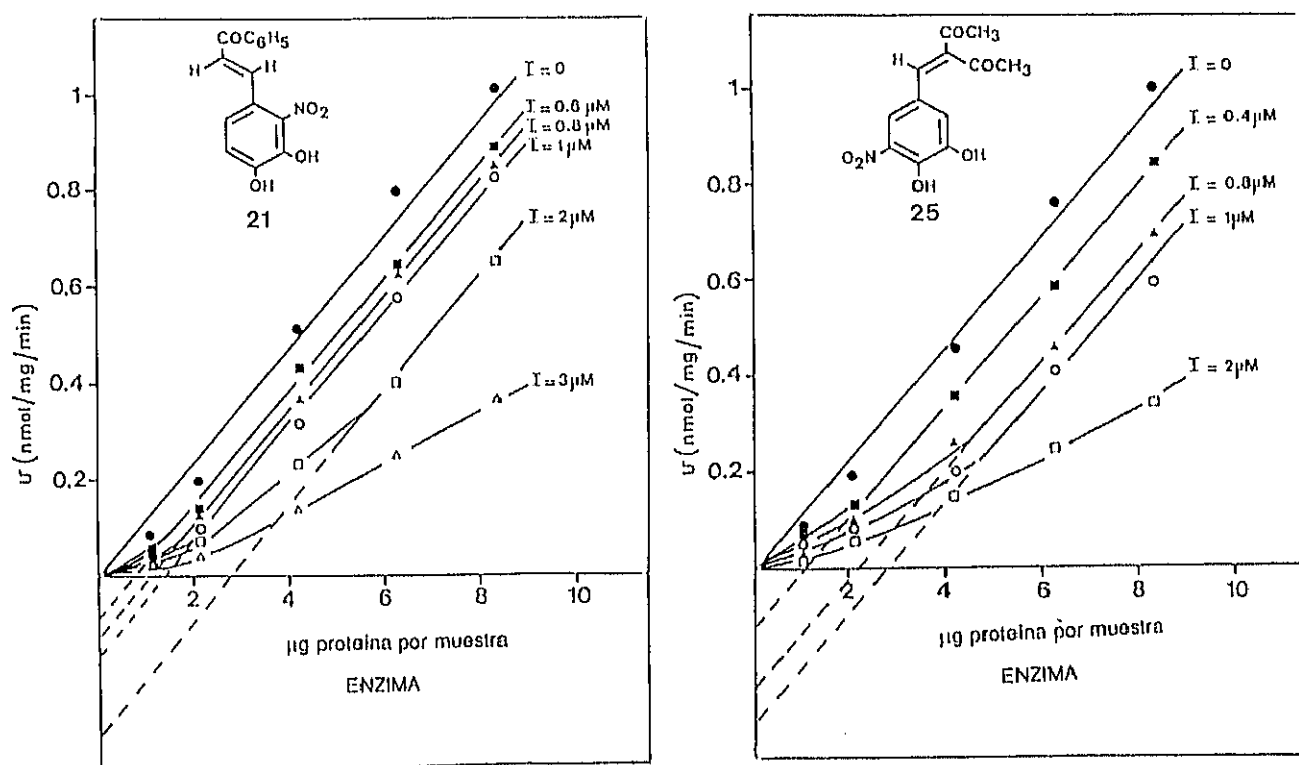
$$v = \frac{k_{cat} S}{K_m + S} E_t - \frac{k_{cat} I_t S}{K_m + S}$$

donde  $k_{cat}$  es la constante de velocidad de primer orden en la ecuación  $ES \longrightarrow E + P$ . En el punto de corte de la asíntota con el eje de abscisas  $E_t = I_t$  y el corte con el eje de ordenadas tiene lugar a  $v = -k_{cat} I_t S / (K_m + S)$ , donde  $I_t$  representa la concentración total de inhibidor.



**Figura 11.** Representación gráfica del inverso de la velocidad inicial frente a concentración de catecol a distintas concentraciones de inhibidor y concentración saturante de SAM.

A partir de la representación de Ackerman-Plotter, y para una concentración de catecol de 20 mM y un valor de  $K_m$  para este sustrato de 2 mM<sup>17</sup>, se obtiene un valor de  $k_{cat}$  de 0,17/min para el compuesto **21** y de 0,29/min para el nitecapone. Por tanto, los valores de  $k_{cat}$  para los dos compuestos estudiados son análogos, aunque 80 veces más bajos que los descritos en la literatura para el nitecapone, cuando se utiliza en los ensayos COMT aislada de hígado de rata<sup>140</sup>. Al igual que en casos anteriores, la diferencia observada entre estos resultados puede deberse a que la enzima se aisló de distintas fuentes, y a la baja afinidad del catecol por COMT en comparación con otros sustratos catecólicos.



**Figura 12.** Representación de Ackermann-Plotter. Los ensayos se realizan tras pre-incubar distintas cantidades de enzima e inhibidor a 37°C durante 3 horas. La reacción se inicia por adición del sustrato catecol.

El valor de la constante aparente ( $K_{app}$ ) se obtuvo por representación gráfica de los valores de  $IC_{50}$  frente a las concentraciones de enzima utilizadas en el ensayo<sup>131</sup>. La relación entre ambos viene dada por la ecuación:

$$IC_{50} = E_t / 2 + K_{app}$$

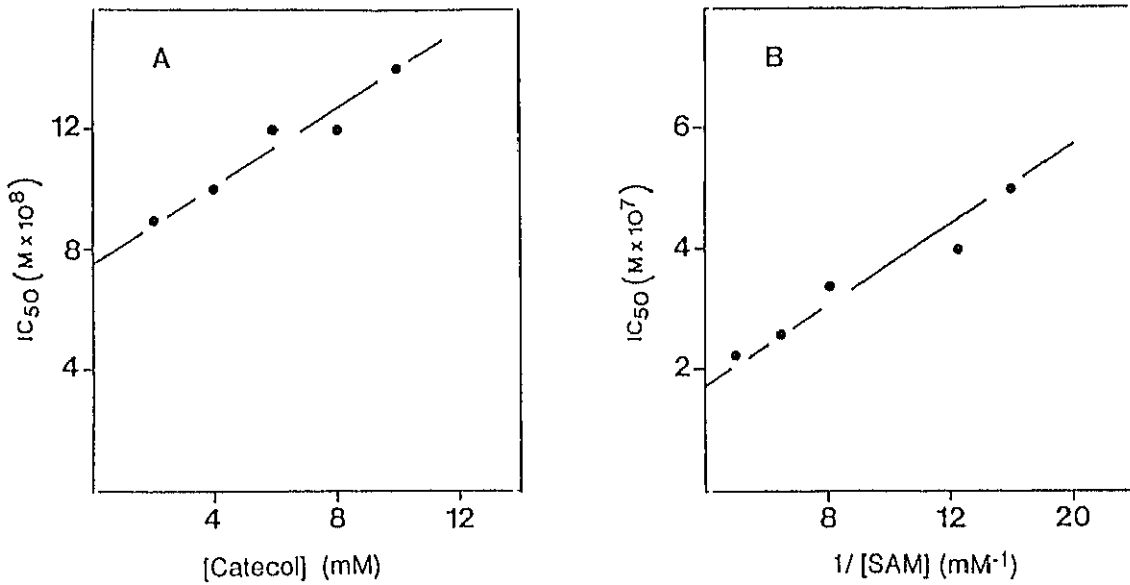
Según esto, la  $K_{app}$  observada en la inhibición de COMT por el compuesto **21** era de  $0,2 \mu M$  cuando el ensayo tenía lugar sin pre-incubación de la mezcla de enzima e inhibidor. Valores similares se obtuvieron cuando se realizó el ensayo tras pre-incubación de la enzima con el inhibidor, a  $37^\circ C$  durante 1 hora, solos o en presencia de  $1,5 \text{ mM}$   $MgCl_2$ ,  $0,9 \text{ mM}$  SAM y  $125 \text{ mM}$  de tampón fosfato pH 7,6.

El valor de  $K_{app}$  obtenido para el nitecapone cuando se realiza el ensayo en las mismas condiciones, fue de  $0,7 \mu M$ . No se observa que tenga lugar un cambio significativo en el valor de la  $K_{app}$  cuando las medidas se realizan sin pre-incubación o con pre-incubación de la enzima con el inhibidor, tanto en ausencia como en presencia de los distintos sustratos que intervienen en el proceso. El valor obtenido con enzima aislada de hígado de cerdo ( $0,7 \mu M$ ) es más alto que el descrito en la literatura para la inhibición de COMT aislada de hígado de rata ( $23 \text{ nM}$ ); por otro lado, en este último caso los autores detectan una disminución significativa en el valor de la constante aparente, cuando se realiza el ensayo tras pre-incubar 1 h la enzima y el inhibidor en presencia de  $MgCl_2$  y SAM ( $0,7 \text{ nM}$ )<sup>140</sup>.

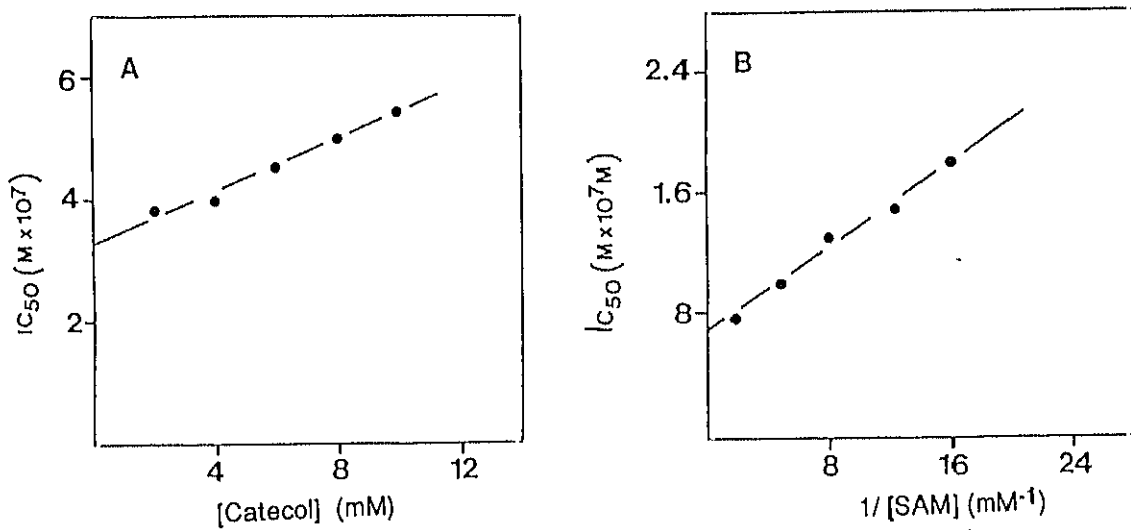
Con el fin de establecer qué tipo de inhibición de COMT tiene lugar con el derivado de vinilfenilcetona **21** y el nitecapone, se determinó la inhibición enzimática en función de las concentraciones de catecol y SAM. Las figuras 13 y 14 muestran las representaciones obtenidas para ambos productos.

Como puede observarse, en ambos casos se obtuvieron patrones de inhibición análogos. Así, cuando el catecol es el sustrato variable, por representación gráfica de los valores de  $IC_{50}$  frente a la concentración del catecol, se obtienen líneas rectas que indican inhibición competitiva con el sustrato catecol. Cuando el estudio de la inhibición enzimática se realiza utilizando concentraciones variables de SAM se observa que la inhibición es acompetitiva frente a este sustrato.





**Figura 13.** Inhibición de COMT por el derivado 21. A. Representación gráfica de los valores de  $IC_{50}$  frente a concentraciones variables de catecol y concentración constante de enzima. Esta representación muestra inhibición competitiva de COMT frente al sustrato catecol. B. Gráfica de  $IC_{50}$  en función de la concentración de SAM, en este caso se observa inhibición acompetitiva de la enzima.



**Figura 14.** Inhibición de COMT por el compuesto 25 (nitecapone). Resultados análogos a los de la anterior figura.

En resumen, la comparación de los resultados obtenidos en nuestras condiciones de ensayo para el compuesto **21** y el nitecapone con los descritos en la bibliografía para este último<sup>140</sup>, permiten concluir que el nuevo derivado de nitrocatecol estudiado **21** presenta gran afinidad por COMT; asimismo, se trata de un inhibidor potente y selectivo, apto para su estudio farmacológico *in vivo*, dirigido a su aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson<sup>12</sup>.

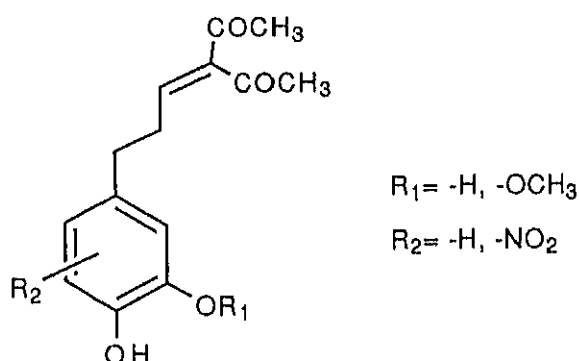
Aunque tanto el compuesto **21** como el nitecapone presentan un valor de  $k_{cat}$  similar, el valor de  $K_i$  obtenido para el primero es unas 4 veces menor que el observado para el nitecapone. Esta mayor afinidad de **21** por la enzima podría deberse a la presencia del grupo nitro en posición 2 en lugar de en 5, a la sustitución en 1 por un grupo más voluminoso o a ambas cosas. En cualquier caso, la síntesis y estudio de compuestos con sustitución del grupo nitro en otras posiciones y otros sustituyentes vinílicos en 1 posiblemente conducirían a la obtención de nuevos inhibidores potentes y selectivos de COMT, previsiblemente reversibles, de uso terapéutico potencial.

Como resultado del estudio realizado con los nuevos 1-vinilderivados de nitroguayacol y nitrocatecol obtenidos, podemos concluir que únicamente uno de los productos sintetizados, el compuesto **17**, actúa como inhibidor irreversible de COMT; mientras que todos los demás son potentes inhibidores reversibles de la enzima.

Como uno de nuestros objetivos era la obtención de nuevos inhibidores irreversibles de COMT, decidimos realizar la síntesis y ensayo de algún producto en el cual el sustituyente vinílico en posición 1 se encontrase a mayor distancia del anillo aromático. Este distanciamiento permitiría la obtención de productos con cadena en posición 1 más larga y flexible, que previsiblemente facilitaría el acceso del grupo vinilo a los grupos SH presentes en el centro activo de la enzima. Por otro lado, con este distanciamiento se elimina la conjugación del doble enlace con el anillo aromático, dotando de esta forma al doble enlace de una mayor reactividad.

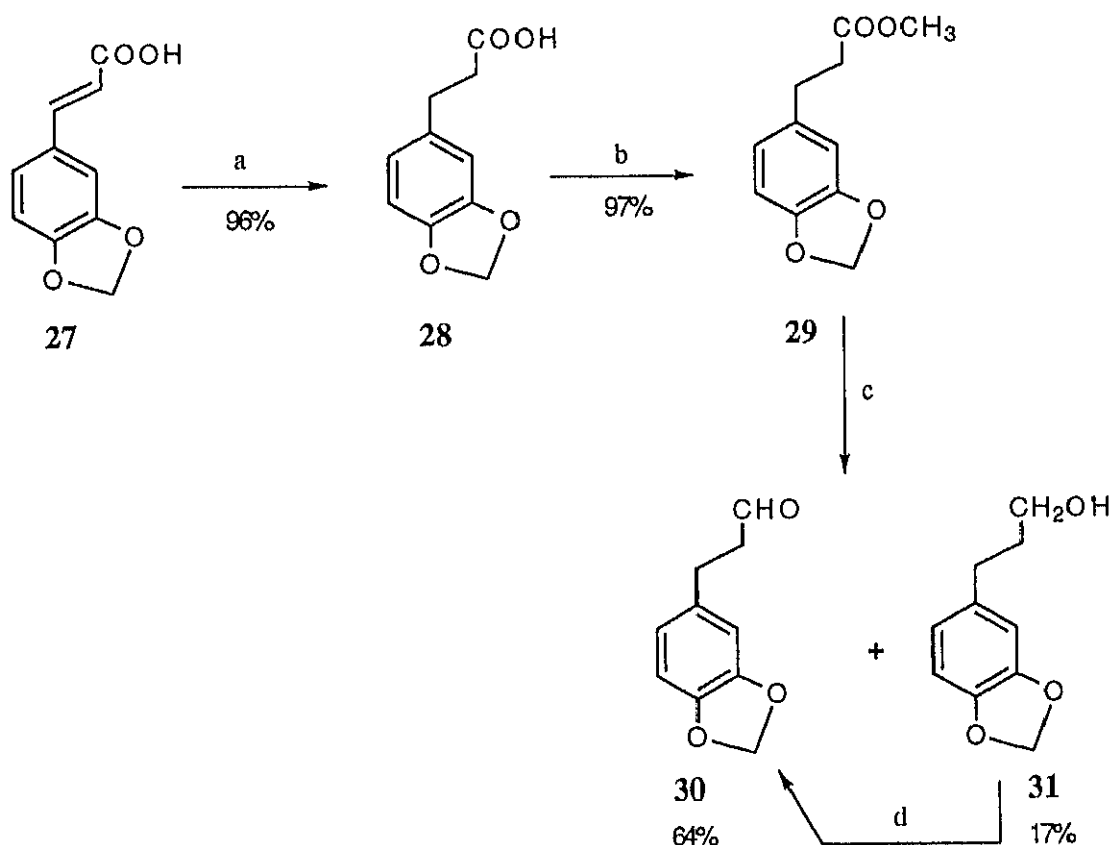
**5. SINTESIS DE DERIVADOS DE  
4-(3,4-DIHIDROXIFENIL)BUT-1-ENO**

Para facilitar el acceso del grupo vinilo del inhibidor a los grupos -SH situados en el centro activo de COMT, e inhibir irreversiblemente la enzima, se decidió llevar a cabo la síntesis de productos de estructura general



La estructura diseñada tendría, al igual que en casos anteriores: 1) dos grupos hidroxilos o un hidroxilo y un metoxilo, con el fin de dotar al producto de afinidad por la enzima; 2) es deseable la presencia de un grupo nitro que incremente la actividad de los productos como inhibidores de COMT; 3) un grupo vinilo capaz de reaccionar con grupos tiol; dicho grupo no debería estar conjugado con el anillo aromático, para que la cadena en posición 1, más larga que en casos anteriores, tenga mayor flexibilidad y mayor reactividad hacia grupos SH.

El primer intento de síntesis de una estructura de estas características se llevó a cabo utilizando como producto de partida el ácido 3,4-metilendioxicinámico (27). Por hidrogenación catalítica de 27 con Pd/C (10%), a temperatura ambiente y presión atmosférica<sup>141</sup>, y posterior esterificación con metanol y ácido sulfúrico<sup>142</sup> se obtuvo el ester 29. La reducción con DIBAL de 29<sup>143</sup> proporcionó el aldehído correspondiente junto con una pequeña cantidad del producto reducido a alcohol, el cual podía ser nuevamente oxidado utilizando dicromato de piridinio (PDC)<sup>144</sup>.

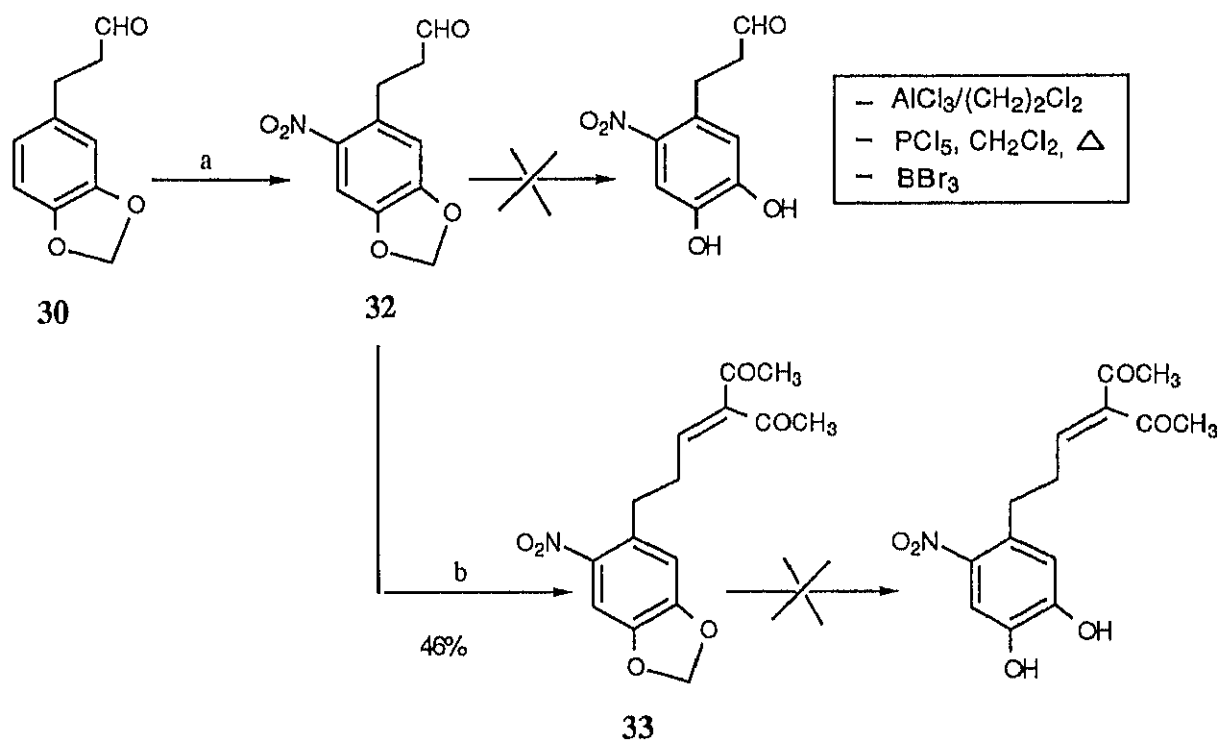


a.  $H_2/Pd$  (c), EtOH. b. MeOH/ $H_2SO_4$ , t.a., 3 días c.  $C_6H_5CH_3$ , DIBAL (1,1 eq),  $-78^\circ C$ . d. PDC,  $CH_2Cl_2$ .

### Esquema 9

La nitración de **30** con ácido nítrico fumante proporcionó el derivado nitrado en posición 6, **32**. Aunque el producto de condensación final, que se obtendría a través de esta ruta sintética, no tendría el grupo nitró en posición *orto* respecto a uno de los grupos hidroxilos, es de esperar que la presencia de este grupo aumente su actividad como inhibidor de COMT (ver apartado 2), aunque en menor grado que si la nitración hubiese tenido lugar en posición 2 o 5.

Los intentos de desprotección del grupo metilendioxo del aldehído **32**<sup>113,116,145</sup> no condujeron en ningún caso a la obtención del correspondiente dihidroxinitroderivado. Tampoco fue posible la desprotección del producto resultante de la condensación en medio ácido de **32** con la 2,4-pentanodiona.

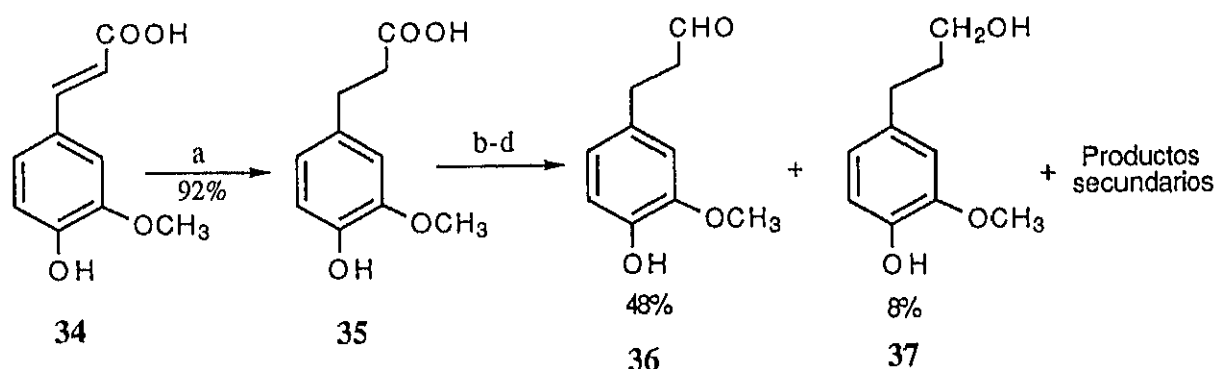


a. 3,5 eq  $\text{HNO}_3$  (l),  $0^\circ\text{C}$ . b.  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{THF}$ .

### Esquema 10

Debido a que no fue posible la desprotección del grupo metilendioxi de 32 y 33, se decidió intentar una nueva ruta sintética para la obtención de este nuevo tipo de inhibidores. El producto de partida utilizado en este caso fue el ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico; de esta forma, aunque no se pudiese eliminar el grupo éter que protege uno de los hidroxilos, tendríamos un compuesto de estructura análoga a la del producto de la reacción enzimática, y por tanto sería factible disponer de un compuesto con afinidad por el centro activo de la enzima.

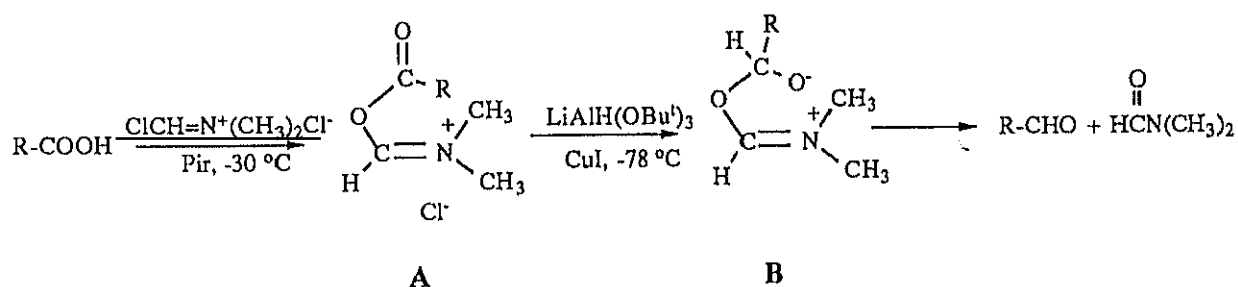
Al igual que ocurrió en la secuencia anterior, el primer paso del esquema sintético es la hidrogenación catalítica del doble enlace del derivado del ácido cinámico 34<sup>141</sup>. La obtención del aldehído tiene lugar de forma directa a partir del ácido 35, utilizando cloruro de clorometilendimetilamonio e hidruro de tri-*tert*-butoxialuminio y litio<sup>146</sup> (esquema 11).



a.  $\text{H}_2/\text{Pd}$  (c). b.  $\text{ClCH=N}^+(\text{CH}_3)_2\text{Cl}^-$ , pir.,  $-30^\circ\text{C}$ . c.  $\text{LiAlH}(\text{O}i\text{Bu})_3$  (1,2 eq),  $\text{CuI}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ . d.  $\text{HCl}$  2N.

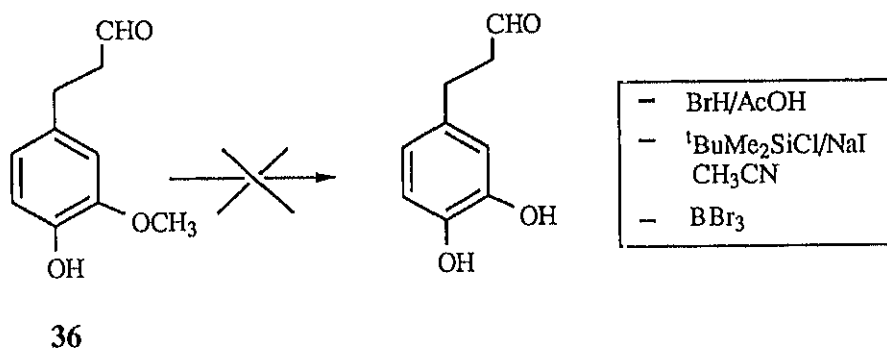
### Esquema 11

El proceso de reducción directa de ácido a aldehído resulta de gran interés, ya que está descrita su compatibilidad con un gran número de grupos, que en su mayoría son susceptibles de reducción por otros hidruros, como el ciano, bromo, ester o nitro<sup>146</sup>. Esta compatibilidad podría permitir llevar a cabo la secuencia sintética partiendo de ácido 3,4-dihidroxicinámico con los hidroxilos protegidos por grupos acetato, o a partir del producto ya nitrado en el caso de que haya dificultades para nitrar el producto una vez reducido a aldehído. El esquema general del proceso de reducción sería el siguiente:



En el primer paso del proceso de reducción tiene lugar la formación de la sal de iminio activa **A** que, por reducción con hidruro de tri-*tert*-butoxialuminio y litio, forma como intermedio la betaína estable **B**, la cual es posteriormente transformada a aldehído por adición de ácido clorhídrico.

Los intentos de desmetilación realizados con el aldehído **36** resultaron infructuosos<sup>113,116,147</sup>. Debido a ello, se decidió sintetizar y ensayar como inhibidor de COMT un derivado de 4-(3-metoxi-4-hidroxifenil)but-1-eno.

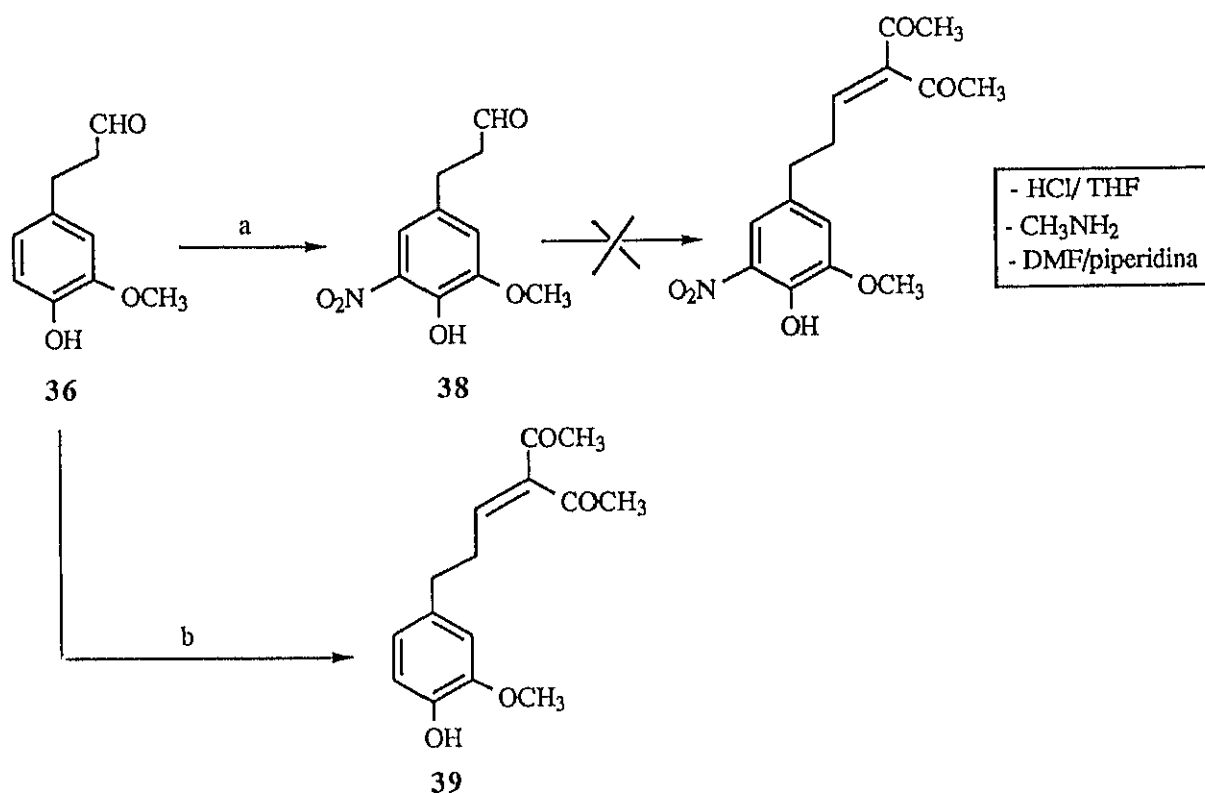


Por nitración del aldehído **36** con ácido nítrico fumante, a  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura, se obtuvo de forma inmediata el derivado nitrado en posición 5, **38**, con un 53% de rendimiento.

La reacción de condensación del aldehído **38** con 2,4-pentanodiona se intentó llevar a cabo en medio ácido, en medio básico, o a través de la formación de una base de Schiff, no obteniendo en ningún caso el vinilderivado deseado (esquema 12). La condensación con 2,4-pentanodiona sí fue posible en medio ácido cuando el aldehído de partida era el compuesto **35**. En este caso, se aisló el producto de condensación **39** algo impurificado y con rendimiento bajo (tras tratamiento en dos columnas de cromatografía en gel de sílice se seguía obteniendo **39** algo impuro; rendimiento aproximado del proceso de condensación 28%).

Debido a la imposibilidad de llevar a cabo la purificación de **39** por cromatografía en gel de sílice, se realizó la purificación de 20 mg del mismo, utilizando HPLC con una columna semipreparativa, con el fin de obtener el producto puro para ensayo como inhibidor de COMT. En dicho proceso, únicamente fue posible el aislamiento de 11 mg de **39** y 7 mg del producto impurificado.





a. 5 eq  $\text{HNO}_3$  (f),  $-24^\circ\text{C}$ . b.  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ , HCl, THF.

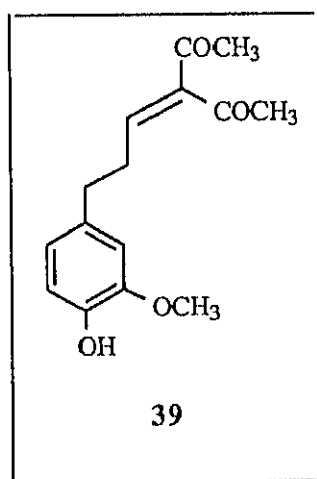
### Esquema 12

Los intentos de condensación con acetofenona, del aldehído **36** y del correspondiente derivado nitrado **38** con el fin de obtener algún otro producto, resultaron infructuosos.

Con el único producto obtenido se procedió al ensayo de inhibición *in vitro* de COMT aislada de hígado de cerdo. Aunque debido a la ausencia del grupo nitro era de esperar que **39** no fuese un inhibidor de COMT muy activo, su ensayo permitiría ver si la elongación de la cadena que soporta el grupo vinilo facilita el acceso del mismo a grupos SH presentes en el centro activo de la enzima o próximos a él.

**6. INHIBICION DE COMT POR [3-(4-HIDROXI-3-METOXI  
FENIL)PROPILIDEN]-2,4-PENTANODIONA (39)**

Los ensayos de inhibición de COMT por el producto **39** se realizaron, al igual que en casos anteriores, en dos condiciones experimentales: sin-preincubación de la mezcla enzima-inhibidor y con pre-incubación de la misma.



Los ensayos sin pre-incubación se llevaron a cabo en ausencia de DTT, para evitar la adición del mismo al doble enlace de **39**. Esta experiencia se realizó a dos concentraciones:  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M; los valores elegidos para este estudio son altos ya que, al tratarse de un análogo del producto de la reacción y carecer de grupo nitro en el anillo aromático, es de esperar que presente poca afinidad por la enzima. Así, a la concentración más baja de inhibidor no se observa inhibición de COMT, y a la más alta se observa una inhibición de aproximadamente un 12%. Estos resultados parecen confirmar la hipótesis de que **39** es un producto con poca afinidad por el centro activo de la enzima.

Cuando se analizan los resultados obtenidos en el ensayo con pre-incubación, se observa un incremento sustancial en los porcentajes de inhibición para ambas concentraciones de inhibidor. Tras 15 minutos de pre-incubación de la mezcla enzima-inhibidor, se obtiene un

40% de inhibición a la concentración más baja estudiada y un 84% cuando la concentración de inhibidor es de  $10^{-4}$  M.

La dependencia de la inhibición con el tiempo de pre-incubación puede indicar un comportamiento irreversible de **39**. Con el fin de establecer si efectivamente se trata de un inhibidor irreversible, se realizó el ensayo de dilución: tras 1 hora de pre-incubación de enzima y distintas concentraciones de inhibidor, las mezclas fueron diluidas y medida su capacidad inhibidora; en el proceso no se observa recuperación de la actividad enzimática y se obtiene un elevado porcentaje de inhibición aún a la concentración más baja (88% de inhibición a una concentración de  $10^{-4}$ M). Este comportamiento irreversible fue confirmado mediante un ensayo adicional de filtración en G-25; en el cual, se realizó la medida de actividad de una mezcla pre-incubada, antes y después de filtración a través de la columna de Sephadex G-25, no observándose recuperación de la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos en estos ensayos parecen indicar que **39** actúa como inhibidor irreversible, aunque el hecho de que no se observe inhibición de COMT por el mismo cuando no se realiza una pre-incubación de éste con la enzima indica que el compuesto tiene una afinidad muy baja o incluso que la inhibición sigue un proceso al azar.

Los resultados obtenidos con **39** resultan de gran interés, ya que abren una nueva vía hacia el diseño y obtención de nuevos inhibidores irreversibles de COMT. Así, probablemente los nitroderivados de 4-(3,4-dihidroxifenil)but-1-eno por ser análogos del sustrato (dihidroxiderivados), y tener un grupo nitro en el anillo aromático (preferiblemente *orto* respecto a uno de los hidroxilos), es de esperar que produzcan una mayor inactivación de COMT y actúen como potentes inhibidores irreversibles de la enzima.

## ***PARTE EXPERIMENTAL***

## **PREPARACION Y CARACTERIZACION DE PRODUCTOS**

## TECNICAS GENERALES

La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en placas de gel de sílice sobre aluminio (Merck, Kieselgel 60, F 254). Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron en gel de sílice (Merck, Kieselgel 60, 230-400 mesh) bajo media presión<sup>148</sup> (cromatografía rápida). Las purificaciones previas se realizaron en columna de gel de sílice (Merck, Kieselgel 60, 70-230 mesh).

Los puntos de fusión se determinaron en un Kofler Thermopan Reicher y no están corregidos.

Los microanálisis se realizaron con muestras secas a vacío sobre  $P_2O_5$  a temperatura ambiente, utilizándose un analizador elemental Perkin Elmer 240.

Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 681, en pastillas de KBr, salvo que se indique otra cosa. Las frecuencias se dan en  $cm^{-1}$ .

Los espectros de  $^1H$ -RMN se registraron en un espectrómetro Varian EM-390 (90 MHz), Bruker AM-200 (200 MHz), Varian Gemini-200 (200 MHz) o Varian XL-300 (300 MHz), en soluciones que se indican en cada caso y TMS como referencia interna. Los espectros de  $^{13}C$ -RMN se registraron en un Bruker WP-80 (20 MHz), un Bruker AM-200 (50 MHz) y un Varian XL-300 (75 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento en Hz.

La separación cromatográfica por HPLC se llevó a cabo en un aparato Waters, utilizando columna semipreparativa de fase normal ( $\mu$ POLASIL), mezcla hexano:acetato de etilo 1:1 (flujo 3 ml/min) como eluyente y un detector de índice de refracción.

Los disolventes y reactivos empleados fueron de calidad analítica y fueron purificados y secados por los procedimientos habituales<sup>149</sup>.

## 1. NITRODERIVADOS DE VAINILLINA

### 1.1 Síntesis de 2-nitrovainillina (1)<sup>103,104</sup>

#### 1.1.1. *O*-Acetilvainillina

A una solución magnéticamente agitada de 5 gr (33 mmol) de vainillina disueltos en 19,7 ml (39,5 mmol) de hidróxido potásico 2N y 8 ml de agua, se añaden lentamente 12,2 ml (0,13 moles) de anhídrido acético. Durante el proceso de adición del anhídrido se observa la aparición de un sólido. La solución, una vez fría, se filtra y el sólido se lava con agua fría, obteniéndose 5,9 gr (rendimiento del 91%) de *O*-acetilvainillina.

P.f.= 75-76 °C; P.f.bibliográfico = 76-77 °C

IR: 1765 (-C=O), 1750 (-C=O), 1250-1200 (d)

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,3 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 3,9 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,2 (d, 1H, J= 7 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,3 (d, 1H, J=1,5 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,4 (dd, 1H, J= 7 Hz, J= 1,5 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,9 (s, 1H, -CHO).

#### 1.1.2. 2-Nitro-*O*-acetilvainillina .

A una solución de 1,1 ml (25,3 mmol, d=1,5) de ácido nítrico fumante del 96%, enfriada a -8 °C y sometida a agitación magnética, se añaden lentamente 5 gr (25,2 mmol) de *O*-acetilvainillina finamente pulverizada. La mezcla de reacción se agita durante 10 minutos y se vierte después sobre hielo picado. Una vez filtrado el sólido obtenido, lavado con agua fría y secado, se aislaron 3,81 gr (rendimiento del 62%) de 2-nitro-*O*-acetilvainillina.



P.f.= 75-79 °C

IR: 1780 (-C=O), 1715 (-C=O), 1550 (-NO<sub>2</sub>), 1375.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,4 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,4 (d, 1H, J= 9 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,7 (d, 1H, J= 9 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,9 (s, 1H, -CHO).

### 1.1.3. 2-Nitrovainillina (1)

La solución magnéticamente agitada de 3 gr (12,3 mmol) de 2-nitro-*O*-acetilvainillina disueltos en exceso de hidróxido sódico al 5%, es acidificada con ácido clorhídrico 2N hasta que deja de observarse la aparición de precipitado. El filtrado de la mezcla, una vez fría, proporciona 2,4 gr (rendimiento del 98%) de un sólido amarillo claro, sensible a la luz, cuyos datos espectroscópicos coinciden con los esperados para el compuesto **1**.

P.f.= 134-136 °C; P f.bibliográfico= 135 °C.

IR: 3620-3000 (a, -OH), 1675 (-C=O), 1600, 1580, 1375.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,9 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,3 (d, 1H, J= 8 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,7 (d, 1H, J= 8 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,8 (s, 1H, -CHO).

Análisis Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,16%.

Hallado: C- 48,58%, H- 3,33%, N- 7,10%.

## 1.2. Síntesis de 6-nitrovainillina (3)<sup>104,105</sup>

### 1.2.1. *O*-*p*-Nitrobencilvainillina

La disolución formada por 6,1 gr (40 mmol) de vainillina, 12,9 gr (60 mmol) de bromuro de *p*-nitrobencilo y 2,1 gr (16 mmol) de carbonato potásico en 80 ml de acetona, se somete a reflujo durante 7 horas. La adición de agua a la mezcla de reacción permite la obtención de 13,4 gr de un sólido que, una vez purificado por cromatografía rápida (hexano:acetato de etilo 4:1), condujo al aislamiento de 10,1 gr (rendimiento del 88%) de *O*-*p*-Nitrobencilvainillina.

P.f.= 124-126 °C; P.f.bibliográfico= 124 °C.

IR: 1680 (-C=O), 1590, 1540-1510 (d), 1355.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5,3 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 7,0 (d, 1H, J= 7,5 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,3 (d, 1H, J= 7,5 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 7,4 (s, 1H, H<sub>2Ar</sub>), 7,6 (d, 2H, J= 9 Hz, H<sub>2,6Ar'</sub>), 8,3 (d, 2H, J= 9 Hz, H<sub>3,5Ar'</sub>), 9,9 (s, 1H, -CHO).

### 1.2.2. 6-Nitro-*O-p*-nitrobencilvainillina

A una disolución formada por 9 gr (31,3 mmol) de *O-p*-nitrobencilvainillina en 90 ml de ácido acético glacial, magnéticamente agitada a 0 °C, se añaden lentamente 19 ml (434 mmol, d= 1,5) de ácido nítrico fumante del 96%. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 horas, transcurrido este tiempo se adiciona sobre hielo picado. Tiene lugar la formación de un sólido amarillo que, tras filtración y posterior recristalización de acetato de etilo, permite la obtención de 6,7 gr (rendimiento del 65%) del 6-nitroderivado.

P.f.= 210-212 °C; P.f.bibliográfico= 212-214 °C

IR: 1700 (-C=O), 1550 (a, -NO<sub>2</sub>), 1505, 1350 (-NO<sub>2</sub>), 1295, 1230.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,97 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5,48 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 7,39 (s, 1H, H<sub>2Ar</sub>), 7,73 (d, 2H, J= 8,6 Hz, H<sub>2,6Ar'</sub>), 7,82 (s, 1H, H<sub>5Ar</sub>), 8,27 (d, 2H, J= 8,6 Hz, H<sub>3,5Ar'</sub>), 10,19 (s, 1H, -CHO).

### 1.2.3. 6-Nitrovainillina (3)

La disolución magnéticamente agitada de 5 gr (15 mmol) de 6-nitrobencilvainillina en 80 ml de ácido sulfúrico concentrado, se calienta entre 50-60 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el crudo rojizo obtenido se adiciona sobre hielo, observándose la aparición de un sólido que adopta un aspecto pastoso al ser filtrado. El crudo se seca a vacío en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> volviendo a adoptar un aspecto sólido. El percolado del mismo en gel de sílice permite la obtención de 1,9 gr (rendimiento del 65%) de 6-nitrovainillina.

P.f.= 208 °C, P.f.bibliográfico= 209 °C.

IR: 3680-3040 (a, 2 bandas, -OH), 1675 (-C=O), 1525 (-NO<sub>2</sub>), 1330 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,3 (s, 1H, H<sub>2Ar</sub>), 7,5 (s, 1H, H<sub>5Ar</sub>), 10,2 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%.

Hallado: C- 48,76%, H- 3,71%, N- 7,33%.

## 2- NITRODERIVADOS DE ISOVAINILLINA

### 2.1. Síntesis de 2-nitro y 6-nitroisovainillina (4 y 6 respectivamente)<sup>106</sup>

Sobre una solución formada por 2 gr (13,1 mmol) de isovainillina en 10 ml de acetona seca, magnéticamente agitada y enfriada a 0 °C, se añaden gota a gota 0,7 ml (16,0 mmol, d= 1,5) de ácido nítrico fumante. La reacción es inmediata. La adición sobre hielo del crudo de reacción conduce a la aparición de un sólido que se filtra posteriormente. En dicho proceso se obtienen 2,1 gr de un sólido mezcla de 2 y 6-nitroisovainillina, los cuales pueden ser separados por cromatografía rápida en gel de sílice (hexano:acetato de etilo 4:1), aislándose 0,58 gr (rendimiento del 27%) de un sólido marrón cuyos datos espectroscópicos coinciden con los esperados para la 2-nitroisovainillina; 1,2 gr (rendimiento del 51%) de un sólido amarillo brillante resultante de la nitración en posición 6 del anillo de isovainillina y 0,24 gr de sólido mezcla de los anteriores.

*2-Nitroisovainillina (4)*

P.f.= 143-145 °C; P.f.bibliográfico= 148-149 °C.

IR: 3600-300 (a, -OH), 1675 (-C=O), 1410, 1285-1260 (d).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4,8-3,4 (ancha, 1H, -OH), 7,3 (d, 1H, J= 7,5 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,6 (d, 1H, J= 7,5 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,8 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%

Hallado: C- 48,46%, H- 3,75%, N- 7,20%

*6-Nitroisovainillina (6)*

P.f.= 185 °C; P.f.bibliográfico= 189 °C.

IR: 3650-3130 (a, -OH), 1700 (-C=O), 1520 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4,7-3,6 (a, 1H, -OH), 7,2 (s, 1H, H<sub>2Ar</sub>), 7,7 (s, 1H, H<sub>5Ar</sub>), 10,2 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%

Hallado: C- 48,88%, H- 3,83%, N- 7,10%

**2.2. Síntesis de 2,6-dinitroisovainillina (16)**

A una disolución formada por 1 gr (6,6 mmol) de isovainillina en 5 ml de acetona seca, sometida a agitación magnética y a 0 °C de temperatura, se adicionan lentamente 1,06 ml (24,2 mmol, d=1,5) de ácido nítrico fumante. La agitación de la mezcla durante 30 minutos y posterior adición sobre hielo-agua permiten la obtención de 1,3 gr de un sólido amarillo. La recrystalización en etanol-agua del mismo conduce al aislamiento de 1,06 gr (rendimiento del 66%) de un producto puro, sensible a la luz, cuyos datos espectroscópicos coinciden con los esperados para el compuesto 16.

P.f.= 159-161 °C; P.f.bibliográfico= 164-165 °C.

IR: 3640-3140 (a, -OH), 1700 (-C=O), 1535 (-NO<sub>2</sub>), 1510 (-NO<sub>2</sub>), 1375, 1355.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4,1 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,9 (s, 1H, H<sub>5Ar</sub>), 10,2 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>: C- 39,64%, H- 2,48%, N- 11,56%.

Hallado: C- 39,54%, H- 2,33%, N- 11,12%.

### 2.3. Síntesis de 5-nitroisovainillina (5)<sup>106</sup>

#### 2.3.1. *O*-Acetilisovainillina .

Por reacción de 2 gr (13,1 mmol) de isovainillina con anhídrido acético, en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 1.1.1., se aislan 2,4 gr de un sólido cuya recrystalización en metanol permite la obtención de 2,15 gr (rendimiento del 83%) de *O*-acetilisovainillina químicamente pura.

P.f.= 84-87 °C.

IR: 1775 (-C=O), 1690 (-C=O), 1515.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,3 (s, 1H, -COCH<sub>3</sub>), 3,9 (s, 1H, -OCH<sub>3</sub>), 7,1 (d, 1H, J= 9 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,6 (d, 1H, J= 3 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,7 (dd, 1H, J= 9 Hz, J= 3 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,8 (s, 1H, -CHO).

#### 2.3.2. 5-Nitro-*O*-acetilisovainillina .

Sobre 3,3 ml (76 mmol, d= 1,5) de ácido nítrico fumante se añaden lentamente, con agitación magnética y a 0 °C, 1,5 gr (7,6 mmol) de *O*-acetilisovainillina finamente pulverizada. La agitación se prolonga durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se adiciona sobre hielo-agua observándose la aparición de un sólido. Por filtración de la mezcla se obtienen 1,4 gr de un producto amarillo sensible a la luz cuya recrystalización en acetato de etilo-hexano proporciona 1,25 gr (rendimiento del 68%) de 5-nitro-*O*-acetilisovainillina pura.

P.f.= 85-57 °C; P.f.bibliográfico= 86 °C.

IR: 1775 (-C=O), 1700 (-C=O), 1550 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2,4 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 8,1 (d, 1H, J= 2 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 8,4 (d, 1H, J= 2 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 10,0 (s, 1H, -CHO).

### 2.3.3. 5-Nitroisovainillina (5)

El proceso tiene lugar en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 1.1.3. por tratamiento de 1,1 gr (4,5 mmol) de 5-nitro-*O*-acetilisovainillina con solución de hidróxido sódico y posterior acidificación con ácido clorhídrico. La recrystalización en agua del crudo permite el aislamiento de 0,5 gr (rendimiento del 53%) de 5-nitroisovainillina pura.

P.f.= 110-113 °C; P.f.bibliográfico= 113 °C.

IR: 3620-3200 (a, -OH), 1700 (-C=O), 1615, 1540 (d).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MH, DMSO-d<sub>6</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,6 (d, 1H, J= 2 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,9 (d, 1H, J= 2 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,9 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%

Hallado: C- 48,89%, H- 3,54%, N- 7,68%

## 3. NITRODERIVADOS DE *o*-VAINILLINA

### 3.1. Síntesis de 5-nitro-*o*-vainillina (8)<sup>107</sup>

A la solución formada por 2 gr (13,1 mmol) de *o*-vainillina y 9,1 ml (160 mmol) de ácido acético glacial, sometida a agitación magnética y 0 °C de temperatura, se adicionan lentamente 0,57 ml (13,1 mmol, d= 1,5) de ácido nítrico fumante en 2,6 ml (45,9 mmol) de ácido acético glacial. La temperatura debe mantenerse entre 10-20 °C. Al empezar a añadir la solución de ácido nítrico se observa un cambio de coloración de la mezcla de reacción de amarillo a marrón-rojizo, que culmina con la aparición de un precipitado amarillo. Por filtración y posterior lavado con agua fría del mismo se obtuvieron 1,72 gr de sólido, que tras recrystalización de agua permitió el aislamiento de 1,63 gr (rendimiento del 63%) de 8.

P.f.= 137-138 °C; P.f.bibliográfico= 140 °C.

IR: 3600-3125 (a, -OH), 3100, 1675 (-C=O), 1525 (-NO<sub>2</sub>), 1320-1275 (2 bandas).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,9 (d, 1H, J= 2,7 Hz, H<sub>4Ar</sub>), 8,2 (d, 1H, J= 2,7 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 10,0 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%

Hallado: C- 48,83%, H- 3,74%, N- 7,35%

### 3.2. Síntesis de 6-nitro-*o*-vainillina (9)<sup>104,108</sup>

#### 3.2.1. *O*-Toluensulfonil-*o*-vainillina

A la solución magnéticamente agitada de 3 gr (19,7 mmol) de *o*-vainillina en 10 ml de agua y 1 gr de hidróxido sódico se añaden lentamente 4,5 gr (23,6 mmol) de cloruro de toluensulfonilo disueltos en 6 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción, se separan dos fases; la fase orgánica se lava con ácido clorhídrico 6N (2 x 5 ml), solución saturada de bicarbonato sódico (1 x 5 ml) y solución saturada de cloruro sódico (1 x 10 ml). La mezcla de fases orgánicas se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 5,77 gr de producto crudo que se purifica por cromatografía rápida en gel de sílice (hexano:acetato de etilo 4:1). Como resultado de este proceso se aislaron 5,31 gr (rendimiento del 88%) de *O*-toluensulfonil-*o*-vainillina.

P.f.= 93-95 °C.

IR: 1700 (-C=O), 1200, 1385, 1180.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,4 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3,6 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,0-7,9 (m, 7H, 7H<sub>Ar</sub>), 10,1 (s, 1H, -CHO).

#### 3.2.2. 4 y 6-Nitro-*O*-tosil-*o*-vainillina

Sobre 52 ml de ácido nítrico fumante (d=1,5), magnéticamente agitados a 0 °C, se añaden de una sola vez 5,2 gr (17,0 mmol) de *O*-tosil-*o*-vainillina. A los 30 minutos, el crudo de reacción se adiciona sobre hielo. El precipitado obtenido se separa por filtración, se lava con

agua y se seca. La cromatografía en capa fina del producto filtrado presentaba dos manchas (hexano:acetato de etilo 1:1,  $R_f = 0,7$  y  $R_f = 0,3$ ) que pudieron ser separadas por cromatografía en gel de sílice, obteniendo 3,26 gr de un sólido amarillo, un 6-nitro derivado, y 2,70 gr de un aceite amarillo que resultó ser una mezcla del 4-nitro derivado y otros productos, en los cuales además de la nitración en posición 4 también se nitraba el grupo tosilo.

### 3.2.3. 6-Nitro-*o*-vainillina (9).

La solución formada por 3,1 gr del 6-nitro derivado obtenido en el apartado anterior y 37 ml de metanol se adicionan, bajo vigorosa agitación magnética, a 1,9 gr de hidróxido potásico disueltos en 4 ml de agua y 8 ml de metanol. La mezcla así formada se mantiene a reflujo durante 30 minutos. En este proceso se obtiene un precipitado rojo que se filtra y redisuelve en agua hirviendo. La solución obtenida se acidifica con ácido clorhídrico concentrado. Nuevamente se observa la aparición de un precipitado que se filtra, se lava con agua fría y se seca, aislándose 1,4 gr de 6-nitro-*o*-vainillina (rendimiento del 91%), sólido amarillo brillante.

P.f. = 101-103 °C, P.f. bibliográfico = 104 °C.

IR: 3640-3200 (a, -OH), 1655 (-C=O), 1515 (-NO<sub>2</sub>), 1330 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,0 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,0 (d, 1H,  $J = 9$  Hz, H<sub>4Ar</sub>), 7,7 (d, 1H,  $J = 9$  Hz, H<sub>5Ar</sub>), 10,5 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%

C- 48,90%, H- 3,51%, N- 6,98%

### 3.3. Síntesis de 4-nitro-*o*-vainillina (7)<sup>109,104,108</sup>

Este producto pudo obtenerse por dos vías: partiendo de *O*-acetil-*o*-vainillina<sup>109</sup> y partiendo del *O*-tosil derivado de *o*-vainillina<sup>104,108</sup> (apartado 3.2.2).



### 3.3.1. *O*-acetil-*o*-vainillina

La disolución formada por 2 gr (13 mmol) de *o*-vainillina en una mezcla de 1,6 ml (16,9 mmol,  $d=1,08$ ) de anhídrido acético y 2,1 ml (26 mmol,  $d=0,98$ ) de piridina, se mantiene en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. La adición de agua a la mezcla de reacción da lugar a la aparición de un sólido blanco. Por filtración, lavado en agua fría del precipitado obtenido y posterior recrystalización en etanol del mismo, se aislaron 2,2 gr (rendimiento del 85%) de producto acetilado.

P.f.= 72-74 °C; P.f.bibliográfico: 76 °C.

IR: 2900 (-CHO), 1770 (-C=O), 1700 (-C=O), 1585, 1490.

$^1\text{H-RMN}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2,4 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 3,9 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,5-7,1 (m, 3H, H<sub>Ar</sub>), 10,1 (s, 1H, -CHO).

### 3.3.2. 4-Nitro-*o*-vainillina (7)

a) A partir de *O*-acetil-*o*-vainillina

A la mezcla de reacción formada por 7,1 ml (162 mmol,  $d=1,5$ ) de ácido nítrico fumante del 96% y 1,3 ml de ácido sulfúrico concentrado, mantenida a -6 °C y sometida a agitación magnética, se añaden lentamente 2,0 gr (10,1 mmol) de *O*-acetil-*o*-vainillina finamente pulverizada. La desaparición del producto de partida, seguida por cromatografía en capa fina (hexano:acetato de etilo 3:1,  $R_f=0,3$ ), tiene lugar 15 minutos después de finalizar la adición. El crudo de reacción se añade sobre hielo, separándose un aceite viscoso. La solución es entonces extraída con (3 x 20 ml) de benceno y el conjunto de extractos orgánicos son lavados con mezcla agua-hielo, agitados 2 veces con solución saturada de bicarbonato sódico fría, y lavados nuevamente con agua fría. La mezcla de fracciones orgánicas se seca sobre sulfato sódico, se filtra y elimina el disolvente a vacío.

El residuo obtenido se calienta a ebullición con 13 ml de solución de hidróxido sódico 2 N. Una vez fría, la mezcla de reacción es acidificada con ácido clorhídrico, observándose la aparición de un precipitado que, una vez filtrado y seco, se purifica mediante percolado en gel de sílice. En dicho proceso se aislaron 0,58 gr (rendimiento del 29%) de un sólido amarillo brillante cuyos datos espectroscópicos coinciden con los esperados para la 4-nitro-*o*-vainillina.

b) A partir del *O*-tosil derivado de *o*-vainillina

El tratamiento de la mezcla de 4-nitro derivados (obtenida en el apartado 3.2.2.) tiene lugar de forma análoga a la indicada en el apartado 3.2.3., aunque en este caso no se observa la aparición de precipitado. La solución obtenida se diluye con agua caliente y se acidifica con ácido clorhídrico. Cuando la solución empieza a enfriarse se observa la aparición de un sólido amarillo, que es filtrado y secado, aislándose 1,0 gr de 4-nitro-*o*-vainillina.

P.f.= 89-92 °C; P.f.bibliográfico= 92-93 °C.

IR: 3640-3000 (a, -OH), 1670 (-C=O), 1530 (-NO<sub>2</sub>), 1300, 1275.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,9 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,5 (d, 1H, J= 7,5 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 7,6 (d, 1H, J= 9Hz, H<sub>5Ar</sub>), 10,3 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>N: C- 48,73%, H- 3,55%, N- 7,10%.

Hallado: C- 48,77%, H- 3,58%, N- 7,05%.

#### **4- NITRODERIVADOS DE 3,4-DIHIDROXIBENZALDEHIDO**

##### **4.1. Síntesis de 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído (10)<sup>111</sup>.**

A una disolución formada por 1,0 gr (5 mmol) de 2-nitrovainillina, 7 ml de diclorometano y 0,73 gr (5,5 mmol) de tricloruro de aluminio sublimado, se adiciona gota a gota y con agitación 1,78 ml (22 mmol) de piridina. La mezcla así formada se somete a agitación durante 4 días, a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se adiciona sobre una mezcla de 34 ml de agua y 2,5 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se desecha la fase orgánica y la fase acuosa se agita durante 1 hora entre 50-55 °C de temperatura. La suspensión obtenida se filtra en caliente y, una vez fría, permite el aislamiento de 0,72 mg (rendimiento del 78%) del producto **10** que pudo ser recrystalizado de agua.

P.f.= 172-175°C; P.f.bibliográfico= 175-178°C.

IR= 3500-3000 (a, -OH), 1670 (-C=O), 1615, 1530, 1520, 1305.

$^1\text{H}$ -RMN (300MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 7,04 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $\text{H}_{5\text{Ar}}$ ), 7,38 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $\text{H}_{6\text{Ar}}$ ), 9,66 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5\text{N}$ : C- 45,90%, H- 2,73%, N- 7,65%.

Hallado: C- 45,72%, H- 2,81%, N- 7,46%.

#### 4.2. Síntesis de 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (11)

La mezcla formada por 2 gr (10 mmol) de 5-nitrovainillina, 52 ml de ácido acético glacial y 61 ml de ácido bromhídrico (45%) es agitada a 150 °C durante 19 horas. El crudo de reacción, una vez frío, es diluido con agua y parcialmente neutralizado con solución saturada de bicarbonato sódico. Se extrae con acetato de etilo (4 x 60 ml) y el conjunto de extractos orgánicos se secan sobre sulfato sódico anhidro; la filtración y posterior eliminación del disolvente a presión reducida, permite el aislamiento de 1,8 gr de crudo. Por recristalización del crudo de reacción en tolueno se obtiene 1,1 gr (rendimiento del 61%) de 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído.

P.f.= 145-146 °C; P.f.bibliográfico= 145-148 °C.

IR: 3600-2990 (a, 2 bandas, -OH), 1690 (-C=O), 1625, 1550, 1350 (a).

$^1\text{H}$ -RMN (90 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 7,5 (d, 1H,  $J = 1,5$  Hz,  $\text{H}_{2\text{Ar}}$ ), 8,0 (d, 1H,  $J = 1,5$  Hz,  $\text{H}_{6\text{Ar}}$ ), 9,8 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5\text{N}$ : C- 45,90%, H- 2,73%, N- 7,65%.

Hallado: C- 45,64%, H- 2,83%, N- 7,56%

#### 4.3. Síntesis de 3,4-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (12)<sup>114,115</sup>

El proceso sintético tiene lugar en atmósfera de argón y con agitación magnética. A la disolución formada por 4,5 gr (34 mmol) de tricloruro de aluminio sublimado añadidos a 9,6 ml de dicloroetano seco, se añaden 2 gr (10,1 mmol) de 6-nitropiperonal disueltos en 8 ml de dicloroetano seco. La reacción se somete a agitación durante 85 minutos, a una temperatura entre -5 y 5 °C; transcurrido este tiempo, se adicionan 24,6 ml (0,2 mol,  $d = 1,45$ ) de ácido bromhídrico 45% frío. La mezcla de reacción es agitada durante 2 días, tras los cuales se observa por cromatografía en capa fina la desaparición del clorometiléter intermedio. Se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. El conjunto de extractos orgánicos se secan sobre

sulfato magnésico anhidro. La filtración y posterior eliminación a vacío del disolvente, permite la obtención de 1,62 gr (rendimiento del 88%) de un sólido amarillo sensible a la luz, cuyos datos espectroscópicos coinciden con los esperados para el compuesto **12**.

P.f.= 196-198 °C; P.f.bibliográfico= 203-204 °C.

IR: 3660-3100 (a, -OH), 1675 (-C=O), 1590, 1340, 1320.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7,2 (s, 1H, H<sub>2Ar</sub>), 7,5 (s, 1H, H<sub>5Ar</sub>), 10,2 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>N: C- 45,90%, H- 2,73%, N- 7,65%.

Hallado: C- 45,91%, H- 2,96%, N- 7,48%.

## **5- NITRODERIVADOS DE 2,3-DIHIDROXIBENZALDEHIDO**

### **5.1. Síntesis de 2,3-dihidroxi-4-nitrobenzaldehído (13)**

Este compuesto se obtuvo de forma análoga a la indicada en el apartado 4.2 utilizando 4-nitro-*o*-vainillina como producto de partida. Por recristalización en agua del crudo se aisló el producto **13** (rendimiento del 65%). Sólido rojizo.

P.f.= 128-130 °C.

IR: 3500-3000 (a, -OH), 1675 (-C=O), 1525 (-NO<sub>2</sub>), 1230.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7,3 (d, 1H, J= 9 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 7,5 (d, 1H, J= 9 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 10,3 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>N: C- 45,90%, H- 2,73%, N- 7,65%.

Hallado: C- 45,70%, H- 2,81%, N- 7,48%.

### **5.2. Síntesis de 2,3-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído (14)**

La reacción de 1 gr (5 mmol) de 5-nitro-*o*-vainillina con ácido acético glacial y ácido bromhídrico, tiene lugar en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 4.2. El crudo

obtenido es purificado mediante percolado rápido en cloroformo:metanol 3:1 ( $R_f = 0.3$ ) obteniéndose 0,68 gr (rendimiento del 74%) de un sólido rojizo cuyos datos espectroscópicos coinciden con los esperados para el producto **14**.

P.f. = 230-233 °C; P.f. bibliográfico = 230-233 °C.

IR: 3660-3000 (a, -OH), 1670 (-C=O), 1525 (-NO<sub>2</sub>), 1365, 1350.

<sup>1</sup>H-RMN (90 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7,8 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H<sub>3Ar</sub>), 8,0 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 10,2 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>N: C- 45,90%, H- 2,73%, N- 7,65%.

Hallado: C- 46,04%, H- 3,01%, N- 8,01%.

### 5.3. Síntesis de 2,3-dihidroxi-6-nitrobenzaldehído (**15**)

A una solución formada por 100 mg (0,5 mmol) de 6-nitro-*o*-vainillina disueltos en 2 ml de diclorometano seco, agitada a -78 °C y bajo atmósfera de argón, se añaden 2 ml (2 mmol, 1M en diclorometano) de tribromuro de boro. La temperatura se deja evolucionar hasta temperatura ambiente. La reacción se sigue por capa fina (hexano:acetato de etilo 2:1,  $R_f = 0,3$ ) observándose la desaparición total del producto de partida tras 65 horas de agitación. La mezcla se diluye con agua y se extrae con éter etílico (2 x 10 ml). El conjunto de extractos orgánicos se extraen con disolución de hidróxido sódico 1N. El residuo acuoso es acidificado con ácido clorhídrico y extraído nuevamente con éter etílico. El conjunto de extractos orgánicos se secan sobre sulfato sódico anhidro. Por filtración y eliminación del disolvente a vacío se obtienen 50 mg de crudo, cuya recristalización en agua permite el aislamiento de 20 mg (rendimiento del 22%) de un sólido marrón que pudo ser caracterizado como **15**.

P.f. = 120-124 °C.

IR: 3700-3000 (a, -OH), 1650 (-C=O), 1530 (-NO<sub>2</sub>), 1340 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7,03 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H<sub>4Ar</sub>), 7,54 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 10,26 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>N: C- 45,90%, H- 2,73%, N- 7,65%.

Hallado: C- 45,64%, H- 2,82%, N- 7,45%.

## 6. 1-VINIL DERIVADOS DE NITROGUAYACOL Y NITROCATECOL

### 6.1. Síntesis de (3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)-2,4-pentanodiona (17).

La disolución formada por 0,5 gr (2,54 mmol) de 5-nitroisovainillina y 0,26 ml (2,54 mmol) de 2,4-pentanodiona en 3 ml de tetrahidrofurano es saturada con ácido clorhídrico gas. La mezcla se agita a 4 °C durante una noche. El disolvente se elimina a vacío y el crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice (hexano:acetato de etilo 2:1) obteniéndose 0,49 gr (rendimiento del 69%) del producto puro **17**.

P.f.= 167-169 °C.

IR: 3500-3000 (a, -OH), 1710 (-C=O), 1645 (-C=O), 1615, 1540 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2,29 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,43 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,92 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,21 (d, 1H, J= 2,0 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,47 (d, 1H, J= 2,0 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 7,62 (s, 1H, -CH=).

<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 26,3 (-COCH<sub>3</sub>), 62,1 (-OCH<sub>3</sub>), 117,7 (C<sub>6Ar</sub>), 121,3 (C<sub>2Ar</sub>), 130,2, 137,6 (-CH=), 143,4, 144,7, 145,8, 152,7, 197,6 (-C=O).

Análisis calculado para C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>N: C- 55,91%, H- 4,65%, N- 5,01%.

Hallado: C- 55,83%, H- 4,90%, N- 5,29%.

### 6.2. Síntesis de [2-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (18)

La reacción de 5-nitroisovainillina y acetofenona tiene lugar en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 6.1, usando metanol como disolvente. Se observa la aparición de un precipitado; tras filtración y secado del mismo, se aísla **18** con un rendimiento del 67%.

P.f.= 180-182 °C.

IR: 3600-3120 (a, -OH), 1660 (-C=O), 1600, 1540 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,90 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,53 (d, 1H, J= 2,0 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,57 (t, 2H, J= 7,4, H<sub>3,5Ar</sub>), 7,64 (d, 1H, J= 16 Hz, =CH-Ar), 7,67 (t, 1H, J= 7,4 Hz, H<sub>4Ar</sub>), 7,89 (d, 1H, J= 16 Hz, =CHCO), 7,94 (d, 1H, J= 2Hz, H<sub>6Ar</sub>), 8,14 (dd, 2H, J=1,3 Hz, J= 7,4 Hz, H<sub>2,6Ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 61,3 (-OCH<sub>3</sub>), 113,8 (C<sub>6Ar</sub>), 120,9 (C<sub>2Ar</sub>), 123,4 (C<sub>Ar</sub>), 128,5 (C<sub>Ar</sub>), 128,7 (C<sub>1Ar</sub>), 130,7, 133,2(-CH=), 137,3, 141,5 (CH=), 145,2, 151,7 (C<sub>5Ar</sub>), 188,9 (-C=O).

Análisis calculado para C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N: C- 64,21%, H- 4,35%, N- 4,68%.

Hallado: C- 64,36%, H- 4,34%, N- 5,11%.

### 6.3. Síntesis del ácido (3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)nitroacético (19)

La condensación de 5-nitroisovainillina y nitroacetato de etilo se realizó de forma análoga a la indicada en el apartado 6.2; aunque el proceso tiene lugar después de agitación durante siete días a 25 °C. La mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. El extracto orgánico se seca sobre sulfato magnésico anhidro, se filtra y el disolvente se elimina a vacío; se obtiene un sólido que tras sucesivas recristalizaciones conduce al aislamiento de **19** con un rendimiento del 17%.

P.f.= 138-141 °C.

IR: 3650-3000 (varias, a), 1530 (a), 1350, 1320.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,43 (d, 1H, J= 1,8 Hz, H<sub>Ar</sub>), 7,45 (d, 1H, J= 1,8 Hz, H<sub>Ar</sub>), 8,09 (s, 1H, =CH-), 10,63 (s ancho, 1H, -OH), 11,43 (s, ancho, 1H, -OH).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 62,1 (-OCH<sub>3</sub>), 114,2 (C<sub>6Ar</sub>), 116,5 (C<sub>2Ar</sub>), 130,6, 142,7, 147,4 (-CH=), 152,8.

#### 6.4. Síntesis de 2,5-bis(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenzildén)ciclopentanona (20).

La reacción de 5-nitroisovainillina (1,01 mmol) y ciclopentanona (0,72 mmol) se lleva a cabo de forma análoga a la indicada en el apartado 6.2. El crudo de reacción se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. El extracto orgánico se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y, por eliminación a vacío del disolvente, se obtienen 0,21 gr (rendimiento del 46%) de un sólido amarillo que fue identificado como 20.

P.f.= Desc. 290 °C.

IR: 3650-3100 (a, -OH), 1620 (-C=O), 1535 (-NO<sub>2</sub>), 1355, 1325.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2,49 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>-), 3,91 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 7,33 (s, 2H, =CH-), 7,47 (d, 2H, J= 2 Hz, H<sub>2,2'</sub>Ar), 7,57 (d, 2H, H<sub>6,6'</sub>Ar).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 25,7 (-CH<sub>2</sub>-), 61,2 (-OCH<sub>3</sub>), 116,4 (C<sub>6Ar</sub>), 121,5 (C<sub>2Ar</sub>), 130,5 (-CH=), 131,1 (C<sub>1Ar</sub>), 138,5 (C<sub>5Ar</sub>), 141,0 (C<sub>4Ar</sub>), 144,9 (C<sub>3Ar</sub>), 151,8 (C=), 194,8 (-C=O).

Análisis calculado para C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>: C- 57,01%, H- 4,07%, N- 6,33%.

Hallado: C- 56,86%, H- 4,14%, N- 6,41%.

#### 6.5. Síntesis de 4-nitro-3-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrofenil)-2-oxo glutarato de etilo (26).

La disolución formada por 0,5 gr (2,53 mmol) de 5-nitroisovainillina, 0,69 ml (6,25 mmol) de nitroacetato de etilo, 0,15 ml (1,5 mmol) de piperidina y 5 ml de dimetilformamida se agita durante 18 horas a temperatura ambiente. Una vez eliminado el disolvente, el crudo obtenido se purifica por cromatografía rápida (hexano:acetato de etilo 3:1), aislándose 0,48 gr (rendimiento del 46%) del sólido blanco 26.

P.f.= 111-113 °C.

IR: 3680-3100 (a, -OH), 2900, 1765 (-C=O), 1730 (-C=O), 1540 (-NO<sub>2</sub>).



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,24 (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1,36 (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 3,98 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4,17 (q, 1H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 4,18 (q, 1H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 4,35 (q, 2H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 4,84 (d, 1H,  $J = 3$  Hz,  $-\text{CH}-$ ), 4,91 (d, 1H,  $J = 3$  Hz,  $-\text{CH}-$ ), 7,24 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz,  $\text{H}_{2\text{Ar}}$ ), 7,42 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz,  $\text{H}_{6\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 13,9 ( $-\text{CH}_3$ ), 14,1 ( $-\text{CH}_3$ ), 51,9 ( $-\text{OCH}_3$ ), 62,4 ( $\text{CH}_2$ ), 62,6 ( $-\text{CHCO}$ ), 63,0 ( $-\text{CH}_2-$ ), 78,1 ( $-\text{CHNO}_2\text{COOEt}$ ), 108,0 ( $\text{C}_{1\text{Ar}}$ ), 115,5 ( $\text{C}_{2\text{Ar}}$ ), 118,7 ( $\text{C}_{6\text{Ar}}$ ), 134,6 ( $\text{C}_{5\text{Ar}}$ ), 141,4 ( $\text{C}_{3\text{Ar}}$ ), 142,9 ( $\text{C}_{4\text{Ar}}$ ), 151,5 ( $\text{COCOOEt}$ ), 157,9 ( $\text{COCOOEt}$ ), 167,6 ( $-\text{COOEt}$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$ : C- 44,44%, H- 4,63%, N- 6,48%.

Hallado: C- 44,51%, H- 4,47%, N- 6,53%.

## 6.6. Síntesis de [2-(3,4-dihidroxi-2-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (21).

La reacción de condensación de 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído con acetofenona tiene lugar en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 6.2. La evaporación del disolvente a vacío conduce a la obtención de un crudo, cuya recristalización en metanol-agua permite el aislamiento del sólido rojo 21 con un rendimiento del 75%.

P.f. = 170-173 °C.

IR: 3480 ( $-\text{OH}$ ), 3320-2900 ( $-\text{OH}$ ), 1650 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 1590, 1565, 1530.

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 7,01 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz,  $\text{H}_{6\text{Ar}}$ ), 7,32 (d, 1H,  $J = 15,3$  Hz,  $=\text{CHCO}-$ ), 7,56 (td, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $J = 1,5$  Hz,  $\text{H}_{3,5\text{Ar}}$ ), 7,62 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz,  $\text{H}_{5\text{Ar}}$ ), 7,67 (tt, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $J = 1,3$  Hz,  $\text{H}_{4\text{Ar}}$ ), 7,81 (d, 1H,  $J = 15,3$  Hz,  $=\text{CHAr}$ ), 8,09 (dd, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $J = 1,3$  Hz,  $\text{H}_{2,6\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 118,0 ( $-\text{CHAr}$ ), 120,0 ( $-\text{CHAr}$ ), 120,3 ( $\text{C}_{1\text{Ar}}$ ), 124,3 ( $-\text{CH}=\text{}$ ), 129,3 ( $2\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129,5 ( $2\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133,8 ( $\text{C}_{4\text{Ar}}$ ), 137,5 ( $-\text{CH}=\text{}$ ), 138,8, 139,4, 141,6, 149,4, 189,5 ( $-\text{C}=\text{O}$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}$ : C- 63,16%, H- 3,86%, N- 4,91%.

Hallado: C- 63,11%, H- 3,81%, N- 4,90%.

### 6.7. Síntesis del ácido (3,4-dihidroxi-2-nitrobenziliden)nitroacético (22)

La reacción de 200 mg (1,1 mmol) de 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído con nitroacetato de etilo (1,1 mmol), tiene lugar en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 6.3. En este proceso se obtienen 240 mg de un crudo que es lavado con agua. La filtración del sólido permite el aislamiento de 96 mg (rendimiento del 32%) del producto **22**. Las aguas de lavado conducen a la obtención de 80 mg de mezcla de productos de condensación y aldehído sin reaccionar.

P.f.= Desc. 190 °C.

IR: 3500, 3475-3100 (a), 1550, 1250.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 6,93 (d, 1H, J= 8,5 Hz, H<sub>Ar</sub>), 6,98 (d, 1H, J= 8,5 Hz, H<sub>Ar</sub>), 7,87 (s, 1H, =CH), 10,60 (s ancho, 1H, -OH), 10,61 (s ancho, 1H, -OH), 11,33 (s, 1H, -COOH).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 117,6 (CH<sub>Ar</sub>), 117,9, 120,0 (CH<sub>Ar</sub>), 139,6, 144,7 (-CH=), 148,36.

### 6.8. Síntesis de 2,5-bis(3,4-dihidroxi-2-nitrobenziliden)ciclopentanona (23).

La reacción a partir de 3,4-dihidroxi-2-nitrobenzaldehído y ciclopentanona se llevó a cabo en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 6.4. La reacción se completó tras 30 minutos de agitación a 4 °C. Durante el proceso se observa la aparición de un precipitado, que una vez filtrado y seco permite el aislamiento del sólido anaranjado **23** con un rendimiento del 75%.

P.f.= Desc. 250 °C.

IR: 3700-3000 (a, -OH), 1675 (-C=O), 1585, 1545 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,00 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>-), 6,95 (s, 2H, =CH-), 7,05 (d, 2H, J= 8,7 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 7,19 (d, 2H, J= 8,7 Hz, H<sub>6Ar</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 27,0 (-CH<sub>2</sub>-), 117,4 (CH<sub>Ar</sub>), 120,5, 122,0 (CH<sub>Ar</sub>), 125,7 (-CH=), 139,4, 140,0, 142,2, 148,5, 194,6 (-C=O).

Análisis calculado para C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub>: C- 55,07%, H- 3,38%, N- 6,76%.

Hallado: C- 55,33%, H- 3,75%, N- 6,54%.

### 6.9. Síntesis del ácido (2,3-dihidroxi-4-nitrobenziliden)nitroacético (24).

La reacción a partir de 2,3-dihidroxi-4-nitrobenzaldehído y nitroacetato de etilo tiene lugar en condiciones análogas a las indicadas en el apartado 6.3., aunque en este caso la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante siete días. El crudo de reacción se recrystalizó de agua, obteniéndose **24** con un rendimiento del 78%.

P.f.= 185-187 °C.

IR: 3600-3100 (a), 1535, 1170.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 7,16 (d, 1H, J= 9,0 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 7,61 (d, 1H, J= 9,0 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 8,46 (s, 1H, =CH-).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 114,9 (CH<sub>Ar</sub>), 116,9 (CH<sub>Ar</sub>), 123,7, 136,3, 142,6, 146,0, 146,4 (-CH=).

### 6.10. Síntesis de (3,4-dihidroxi-5-nitrobenziliden)-2,4-pentanodiona (25)

La condensación del 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzaldehído con la 2,4-pentanodiona tiene lugar de forma análoga a la indicada en el apartado 6.1. Se obtiene el producto **25** con un 77% de rendimiento.

P.f.= 175-178 °C; P.f.bibliográfico= 175-178 °C.

IR: 3400-3100 (a, -OH), 1685 (-C=O), 1650, 1615 (-C=C-), 1540 (-NO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 2,29 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,95 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7,29 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,62 (s, 1H, -CH=), 7,81 (d, 1H, J= 2,1Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,22 (s ancho, 1H, -OH), 10,57 (s ancho, 1H, -OH).

<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 26,3 (-CH<sub>3</sub>), 31,7 (-CH<sub>3</sub>), 118,7 (CH<sub>6Ar</sub>), 121,7 (CH<sub>2Ar</sub>), 125,7, 135,8, 138,1 (-CH=), 143,9, 145,8, 148,8.

Análisis calculado para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>N: C- 54,33%, H- 4,15%, N- 5,28%.

Hallado: C- 54,10%, H- 4,07%, N- 5,08%.

## 7. DERIVADOS DE 4-(3,4-DIHIDROXIFENIL)BUT-1-ENO

### 7.1. Síntesis del ácido 3-(3',4'-metilendioxfenil)propiónico (28)

A una disolución formada por 5 gr (26 mmol) de ácido 3,4-metilendioxicinámico en 150 ml de etanol se añaden 0,5 gr (1% en peso) de paladio sobre carbón (10%) y se somete a hidrogenación a presión atmosférica y a temperatura ambiente. Después de 12 horas de agitación, la mezcla se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose 4,86 gr (rendimiento del 96%) de **28**.

P.f.= 82-84 °C; P.f.bibliográfico= 91 °C.

IR: 3500-3000 (-OH), 1770-1650 (-C=O), 1505, 1450.

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,61 (t, 2H, J= 7,6 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2,85 (t, 2H, J= 7,6 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 5,91 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6,63 (dd, 1H, J= 7,8 Hz, J= 1,6 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 6,68 (d, 1H, J= 1,6 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 6,71 (d, 1H, J= 7,8 Hz, H<sub>5Ar</sub>), 9,96 (s ancho, 1H, -COOH).

Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>: C- 61,85%, H- 5,15%.

Hallado: C- 61,80%, H- 5,15%.

### 7.2- Síntesis de 3-(3',4'-metilendioxfenil)propanoato de metilo (29).

La solución formada por 4,8 gr (25 mmol) del ácido precursor **28**, 150 ml de metanol y ácido sulfúrico, se somete a agitación a temperatura ambiente durante 3 días. La eliminación del disolvente y posterior percolado del crudo de reacción permitió el aislamiento de 5,04 gr (rendimiento del 97%) del éster **29**.

IR (entre cristales): 3100-2810, 1740 (a, -C=O), 1510, 1495, 1450.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2,51 (t, 2H,  $J=7,7$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 2,84 (t, 2H,  $J=7,7$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 3,64 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 5,88 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6,61 (dd, 1H,  $J=7,8$  Hz,  $J=1,8$  Hz,  $\text{H}_{6\text{Ar}}$ ), 6,65 (d, 1H,  $J=1,8$  Hz,  $\text{H}_{2\text{Ar}}$ ), 6,69 (d, 1H,  $J=7,8$  Hz,  $\text{H}_{5\text{Ar}}$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ : C- 63,41%, H- 5,76%.

Hallado: C- 63,09%, H- 6,09%.

### 7.3. Síntesis de 3-(3',4'-metilendioxfenil)propanal (30).

A una solución de 4,8 gr (23,1 mmol) del ester **29** en 95 ml de tolueno destilado, enfriada a  $-78^\circ\text{C}$  y bajo argon, se van añadiendo gota a gota 25,4 ml de disolución 1M de hidruro de diisobutil aluminio en tolueno (25,4 mmol). Una vez finalizada la adición, se mantiene la agitación durante 75 minutos, añadiendo después una pequeña cantidad de metanol. A la solución así obtenida se adicionan alrededor de 25 ml de solución saturada de tartrato de sodio y potasio, se somete a agitación durante 30-60 minutos y se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos se secan sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. Se obtiene un aceite, mezcla de varios productos. Por cromatografía rápida en hexano:acetato de etilo (6:1) se aislan 480 mg (10%) de producto de partida sin reaccionar, 707 mg (17%) del correspondiente alcohol **31** y 2,64 gr (64%) del aldehído **30**.

IR (entre cristales): 3030-2790 (a), 2730, 1750 (a,  $-\text{C}=\text{O}$ ), 1610.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2,66 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 2,81 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 5,85 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6,56 (dd, 1H,  $J=7,9$  Hz,  $J=1,7$  Hz,  $\text{H}_{6\text{Ar}}$ ), 6,61 (d, 1H,  $J=1,7$  Hz,  $\text{H}_{2\text{Ar}}$ ), 6,66 (d, 1H,  $J=7,9$  Hz,  $\text{H}_{5\text{Ar}}$ ), 9,73 (m, 1H,  $-\text{CHO}$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ : C- 67,41%, H-5,62%.

Hallado: C- 67,38%, H- 5,89%.

### 7.4. Síntesis de 3-(3',4'-metilendioxi-6-nitrofenil)propanal (32).

A una disolución formada por 2,4 gr (13,5 mmol) del aldehído **30** y 8 ml de dicloroetano, magnéticamente agitada a  $-15^\circ\text{C}$ , se añaden lentamente 3,97 ml (94,4 mmol) de ácido nítrico fumante  $d=1,5$ . La reacción se completa 30 minutos después de su inicio. El crudo de reacción se adiciona sobre hielo-agua. Se extrae con acetato de etilo y el extracto orgánico se

seca sobre sulfato sódico anhidro. Tras eliminar el disolvente a vacío, el crudo de reacción se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (hexano:acetato de etilo 5:1) obteniendo 1,38 gr (rendimiento del 46%) de **32**.

P.f.= 65-66 °C.

IR (Nujol): 3050, 3030-2780 (a), 2730, 1715 (a, -C=O), 1620.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,81 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 3,10 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 6,03 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6,73 (s, 1H, H<sub>2Ar</sub>), 7,45 (s, 1H, H<sub>5Ar</sub>), 9,76 (s, 1H, -CHO).

Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>N: C- 53,81%, H- 4,04%, N- 6,28%.

Hallado: C- 53,82%, H- 4,14%, N- 6,27%.

### 7.5. Síntesis del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propiónico (**35**).

La reacción a partir de ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico **34** se lleva a cabo de forma análoga a la indicada en el apartado 7.1. La obtención del producto **35** tiene lugar con un rendimiento del 92%.

IR= 3650-3300 (a, -OH), 1700 (a, -C=O), 1520, 1440.

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2,90 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3,87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6,87-6,68 (m, 3H, H<sub>Ar</sub>).

Análisis calculado para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>: C- 61,20%, H- 6,10%.

Hallado: C- 61,40%, H- 6,20%.

### 7.6. Síntesis de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propanal (**36**)

A la disolución formada por adición bajo argón de 22 ml de acetonitrilo y 35,4 ml de tetrahidrofurano a 1,9 gr (14,32 mmol) de cloruro de clorometilendimetil amonio 95%, se añade una solución formada por 2,81 gr (14,32 mmol) de ácido **35** y 1,14 ml (14,32 mmol) de piridina en 22 ml de tetrahidrofurano, a -30 °C. La mezcla se agita durante 21 horas a la misma temperatura. A continuación se añade una suspensión de 1,3 mmol de ioduro de cobre (I) en tetrahidrofurano y 17,18 ml (17,18 mmol) de solución de hidruro de tri-*terc*-butoxi aluminio y

litio 1M en tetrahidrofurano a  $-78^{\circ}\text{C}$ . La mezcla de reacción se agita durante 10 minutos, se añade solución de ácido clorhídrico 2N y se extrae con éter. La fase orgánica se lava con solución saturada de bicarbonato sódico, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y el disolvente se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por cromatografía rápida en gel de sílice (hexano:acetato de etilo 1:1), obteniéndose 1,23 gr (rendimiento del 48%) del aldehído **36** y 0,87 gr de mezcla del correspondiente alcohol **37** y productos secundarios.

IR (entre cristales): 3650-3100 (a, -OH), 2990-2700 (varias bandas, a, -CHO), 1720 (a, -C=O), 1520.

$^1\text{H}$ -RMN (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2,72-2,80 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2,86-2,94 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3,87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5,51 (s, 1H, -OH), 6,66-6,87 (m, 3H, H<sub>Ar</sub>), 9,80-9,82 (m, 1H, -CHO).

Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ : C- 66,67%, H- 6,67%.

Hallado: C- 66,72%, H- 6,38%.

### 7.7. Síntesis de 3-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)propanal (**38**)

A una disolución formada por 0,5 gr (2,8 mmol) del aldehído **36** en 10 ml de éter etílico, agitada a  $-24^{\circ}\text{C}$ , se adicionan lentamente 5 equivalentes de ácido nítrico fumante. Pasados 10 minutos, el crudo de reacción se adiciona sobre hielo. La solución se extrae con acetato de etilo; la mezcla de fases orgánicas se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y elimina el disolvente a vacío. El crudo de reacción se purifica en columna de gel de sílice (hexano:acetato de etilo 1:2) obteniendo 0,33 gr del aldehído **38**, rendimiento del 53%.

P.f.=  $87-90^{\circ}\text{C}$

IR: 3650-3120 (2 bandas, a, -OH), 3100, 1710 (-C=O), 1545 (a, -NO<sub>2</sub>).

$^1\text{H}$ -RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2,81-3,91 (m, 4H, 2 -CH<sub>2</sub>-), 3,91 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,24 (d, 1H, J=2,1 Hz, H<sub>2Ar</sub>), 7,49 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H<sub>6Ar</sub>), 9,8 (s, 1H, -CHO), 10,94 (s, 1H, -OH).

Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}$ : C- 53,33%, H-4,88%, N- 6,22%.

Hallado: C- 53,69%, H- 5,02%, N-5,98%.

### 7.8. Síntesis de [3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propiliden]-2,4-pentanodiona (39)

La mezcla agitada de 0,30 gr del aldehído **36** y 0,17 ml de 2,4-pentanodiona en 2,5 ml de tetrahidrofurano es saturada con ácido clorhídrico gas. La disolución se agita a 4 °C durante 21 horas. El crudo de reacción se diluye con agua y se extrae con diclorometano. El extracto orgánico se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y el disolvente se elimina a vacío. Se obtienen 0,41 gr de un crudo que mediante cromatografía en columna (hexano:acetato 2:1) permitió el aislamiento de 0,16 gr del producto de condensación **39** algo impuro (aproximadamente un 22% de impureza). Una nueva cromatografía tampoco proporcionó el producto puro (rendimiento aproximado del proceso de condensación tras las dos cromatografías en gel de sílice: 28%). Se purificaron 20 mg de producto por HPLC, obteniendo 11 mg de **39** y 7 mg de producto impuro.

IR (entre cristales): 3650-3100 (-OH), 1705 (-C=O), 1665 (-C=O), 1515 (-NO<sub>2</sub>), bandas anchas.

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,17 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,26 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,57-2,49 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2,72-2,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph), 3,85 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5,54 (s, 1H, -OH), 6,85-6,50 (m, 4H, 3H<sub>Ar</sub>, -CH=).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 26,1 (-CH<sub>3</sub>), 31,5 (-CH<sub>2</sub>-), 34,4 (-CH<sub>2</sub>Ar), 55,9 (-OCH<sub>3</sub>), 110,9 (CH<sub>Ar</sub>), 114,4 (CH<sub>Ar</sub>), 121,0 (CH<sub>Ar</sub>), 132,0, 144,2, 145,5, 145,6 (CH=), 146,6, 197,0 (-CO-)



## **ENSAYOS BIOLOGICOS**

## MATERIALES Y METODOS

Los productos generales utilizados eran de la máxima pureza y procedían de las firmas comerciales Sigma, Merck, Fluka o Aldrich. La [ $^3\text{H}$ ]-SAM de actividad específica 15 Ci/mmol se obtuvo de Amersham y la SAM sin marcar utilizada de Boehringer Mannheim. Los materiales para la filtración en gel se obtuvieron de Pharmacia.

Las centrifugas utilizadas fueron Sorvall con rotores SS34 y GSA. Para el conteo de las muestras radiactivas se utilizó un contador de centelleo líquido LKB, modelo Rackbeta 1219. Las medidas de absorbancia de UV se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo  $\lambda$  serie PECCS.

### 1. PREPARACION DE COMT

La enzima utilizada en los ensayos se aisló de hígado de cerdo siguiendo el método utilizado por Nikodejevic y cols.<sup>121</sup> ligeramente modificado en nuestro laboratorio<sup>17</sup>. Todo el proceso de purificación de la enzima tuvo lugar a 4 °C. Una vez troceado el tejido, se homogeneizó en una solución al 2% de KCl (p/v) utilizando un homogeneizador de aspas (Sorvall) durante 10 min. Se centrifugó a 12.000 g durante 30 min. y el sobrenadante se ajustó cuidadosamente con ácido acético 1M a un pH de 5,0, agitando la suspensión durante 15 minutos más, se procedió a una nueva centrifugación en idénticas condiciones. El nuevo sobrenadante se neutralizó con NaOH 1M y se sometió a precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; en primer lugar se llevó a 30% de saturación (0,16 gr/ml), descartando el precipitado obtenido después de centrifugar 20 min a 17.000 g; seguidamente, el sobrenadante se llevó a 50% de saturación con sulfato amónico y la proteína precipitada se sedimentó en las

mismas condiciones anteriores. El precipitado se redisolvió en el mínimo volumen de tampón fosfato 10 mM pH 7,0.

La solución así obtenida se filtró a través de una columna (5 x 60 cm) rellena de Sephadex G25 de grado medio (tamaño de partícula 50-150  $\mu$ m), previamente equilibrada con tampón fosfato 10 mM pH 7,0. La proteína se eluyó con un flujo de 2 ml/min y una vez eluida se concentró bajo presión de N<sub>2</sub> en una célula Amicon hasta un volumen aproximado de 50 ml. El concentrado así obtenido se aplicó a una columna de Sephadex G200 (5 x 90 cm) y se eluyó en las condiciones descritas anteriormente. Se midió actividad y absorbancia de las fracciones recogidas y, aquellas que presentaron actividad se reunieron y mezclaron bien antes de ser distribuidas en alícuotas de 1 ml, las cuales se congelaron a -30 °C.

## 2. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas de la preparación enzimática (concentración de proteínas >0,2 mg/ml) fue determinada de acuerdo con el método microbiuret de Goa<sup>150</sup> que utiliza el reactivo de Benedict, empleando albúmina de suero bovino cristalizada como referencia.

Para la elaboración de la curva patrón se tomaron varias concentraciones de albúmina bovina entre 0,2 y 0,4 mg/ml de proteína y se añadieron a cada una 2 ml de NaOH 1N y 0,2 ml de reactivo de Benedict; tras 20 min. de reposo se midieron los valores de absorbancia observados para cada muestra a  $\lambda = 330$  nm. La medida de la concentración de proteína de la preparación enzimática se realizó tomando alícuotas de ésta y realizando el mismo procedimiento descrito para la albúmina bovina, los valores obtenidos se llevaron a la recta patrón obteniendo el valor de la concentración de proteínas de dichas muestras.

### 3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Para determinar la actividad de la preparación enzimática se siguió el método radioquímico descrito por Zürcher y Da Prada<sup>122</sup> ligeramente modificado en nuestro laboratorio<sup>17</sup>.

En cada uno de los experimentos, la mezcla de reacción de 0,25 ml contenía: enzima (1 unidad, definida como la cantidad de proteína que cataliza la transformación de 1 nmol de sustrato por minuto), catecol 20 mM, [<sup>3</sup>H]-SAM 0,9 mM (1,6 Ci/mol), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DTT 2,5 mM y tampon fosfato 125 mM pH 7,6. La reacción se inició por adición de la enzima precalentada a 37 °C. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 10 minutos, tras los cuales se adicionaron 0,25 ml de ácido cítrico frío 1M para cortar la reacción. Se prepararon blancos en los cuales se añadió el ácido cítrico antes que la solución enzimática.

En los viales de centelleo en los que se llevó a cabo la reacción enzimática, se añadieron 1,5 ml de hexano:tolueno (4:1, v/v) conteniendo 2,5-difeniloxazol al 0,4% (p/v) y 1,4-bis-(2-[5-feniloxazolil])benceno al 0,01% (p/v) y se agitaron los tubos vigorosamente durante 30 segundos. La radiactividad presente en la fase orgánica se determinó directamente en los viales.

### 4. ESTUDIOS CINETICOS DE INHIBICION DE COMT

Los ensayos de inhibición de COMT se realizaron usando una concentración fija de enzima, concentraciones saturantes de ambos sustratos (catecol y [<sup>3</sup>H]-SAM) y un tiempo de reacción de 10 minutos. Para fijar las condiciones de ensayo se determinó en primer lugar la proporcionalidad de la actividad enzimática con la concentración de proteína y con el tiempo de incubación. En las condiciones fijadas (1U, 10 min) la cantidad de sustrato transformado no superaba el 5% de la concentración inicial, asegurándose así la medida de velocidades iniciales.

#### 4.1. Determinación de valores de IC<sub>50</sub>

Las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo a distintas concentraciones del inhibidor ensayado. Los inhibidores a ensayar se disolvieron en DMSO, a una concentración 50 mM. Las diferentes concentraciones de inhibidor se obtuvieron por dilución con agua de la anterior, de tal forma que la concentración final de DMSO en la mezcla de reacción no superaba el 3%, concentración que se había comprobado que no afectaba a la actividad enzimática. La actividad residual se determinó siguiendo el método descrito en el apartado 3.

#### 4.2. Ensayos de inhibición de COMT

##### 4.2.1. *Inhibición reversible, sin pre-incubación de enzima e inhibidor.*

Manteniendo fija la concentración de uno de los sustratos, se varió la concentración del otro sustrato y se midió la actividad en presencia de distintas concentraciones de inhibidor. La reacción se inició por adición de enzima, equilibrando previamente a 37 °C ambas soluciones (enzimática y mezcla de reacción).

##### 4.2.2. *Inhibición irreversible, con pre-incubación de enzima e inhibidor.*

Se preparó una mezcla 150 mM en tampón fosfato potásico pH 7,6, distintas concentraciones de inhibidor (o el mismo volumen de agua en los controles) y solución enzimática que se pre-incubó a 37 °C (iniciando la pre-incubación por adición de la enzima). A tiempos fijos de pre-incubación se determinó la actividad residual según el método indicado anteriormente.

Para establecer la existencia de inhibición irreversible se llevaron a cabo ensayos adicionales por los métodos siguientes:

### A. Método de dilución

Se prepararon 100  $\mu$ l de una mezcla concentrada de solución enzimática y diferentes concentraciones de inhibidor (o el correspondiente volumen de agua en los blancos) que se incubó a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se diluyó 20 veces tomando una alícuota de 12,5  $\mu$ l y se determinó la actividad residual por el procedimiento descrito anteriormente (esto supone una dilución de 20 veces respecto a la mezcla pre-incubada). Asimismo, se llevó a cabo la determinación de la actividad residual cuando se realizó el proceso sin pre-incubación de la mezcla enzima-inhibidor, a concentraciones de este último tales que sus valores en mezcla de reacción se correspondían con los utilizados en el ensayo con pre-incubación.

### B. Método de diálisis

Se prepararon 500  $\mu$ l de mezcla de solución enzimática e inhibidor o la cantidad correspondiente de agua (mezcla control).

La medida de actividad de las muestras tuvo lugar en primer lugar sin pre-incubación de las mismas y posteriormente tras una hora de incubación a 37 °C. La reacción se inició por adición de 25  $\mu$ l de la mezcla enzimática. Los 400  $\mu$ l restantes de solución enzimática pre-incubada, se dializaron frente a tampón fosfato 10 mM pH 7 durante 20 horas y a 4 °C de temperatura. Las medidas de actividad de la mezcla dializada se realizaron con alícuotas de 50  $\mu$ l de extracto enzimático, observándose la pérdida casi total de la actividad enzimática tras el proceso de diálisis.

### C. Método de filtración a través de Sephadex G25.

Se preparó una mezcla de 200  $\mu$ l de solución enzimática e inhibidor, o la correspondiente cantidad de agua (mezcla control).

Las medidas de actividad tuvieron lugar en dos condiciones: sin pre-incubación de las muestras y tras una hora de pre-incubación a 37 °C. La reacción se inició por adición de 25  $\mu$ l de la mezcla enzimática. Los 100  $\mu$ l de mezcla pre-incubada se aplicaron sobre una columna de

Sephadex G25 y se eluyó con: tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM EDTA y 1 mM DTT. La medida de actividad residual se realizó con 100  $\mu\text{l}$  de la fracción activa resultante del proceso de filtración.

## 5. ANALISIS DE LOS RESULTADOS CINETICOS

El primer análisis de los datos cinéticos de inhibición reversible de COMT se realizó mediante representación de Lineweaver-Burk<sup>134</sup>. Las constantes cinéticas se calcularon en un ordenador personal, utilizando un programa FORTRAN IV descrito por Cleland<sup>151</sup>, al introducir las ecuaciones cinéticas de los distintos tipos de inhibición reversible y los datos experimentales.

Los valores de las constantes de velocidad,  $K_{\text{cat}}$ , de la inhibición de COMT por los productos que actuaban como inhibidores de tipo "tight-binding", se determinaron a partir de la representación de Ackerman-Plotter<sup>139</sup>. El valor de la  $K_i$  aparente es el punto de corte en el eje de ordenadas al realizar la representación gráfica de los valores de  $\text{IC}_{50}$  frente a la concentración de enzima<sup>131</sup>.

El análisis de las constantes de velocidad de la inactivación irreversible de COMT se realizó siguiendo la ecuación descrita por Ray y Koshland<sup>129</sup> y la aproximación gráfica utilizada por Borchardt y Thakker<sup>98</sup>. Una vez realizado un cálculo previo de las constantes cinéticas, se utilizó el programa de regresión no lineal Enzfitter al que se introdujo la ecuación apropiada para el análisis de los datos.

## ***CONCLUSIONES***



Como consecuencia del trabajo de Tesis Doctoral recopilado en esta Memoria puede hacerse un resumen del mismo y establecer las siguientes conclusiones:

1. Se han sintetizado y evaluado *in vitro* como inhibidores de COMT 9 nitroderivados de hidroximetoxibenzaldehído y 6 nitroderivados de dihidroxibenzaldehído.
2. Los estudios de inhibición de COMT, aislada de hígado de cerdo, por los derivados de benzaldehído, muestran que mientras que todos los dihidroxinitrobenzaldehydos actúan como inhibidores de COMT, únicamente un hidroximetoxinitroderivado, la 5-nitro isovainillina, se comporta como tal.
3. La 5-nitroisovainillina es un inhibidor de tipo competitivo con el catecol y acompetitivo con SAM; los análogos del sustrato catecol actúan como inhibidores mixtos frente a catecol y acompetitivos frente a SAM.
4. La actividad inhibidora de los dihidronitrobenzaldehydos estudiados depende de la posición relativa del grupo nitro. Los nitroderivados más activos como inhibidores son los que tienen el grupo nitro en posición *orto* respecto a uno de los grupos hidroxilo.
5. Se han sintetizado y ensayado como inhibidores de COMT una serie de 1-vinilderivados de nitrocatecol y nitroguayacol; compuestos dotados de un grupo vinilo reactivo hacia grupos -SH. Solo uno de estos productos, la 3-(3-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenciliden)-2,4-pentanodiona (17) actúa como inhibidor irreversible de COMT, y modifica dos grupos -SH de la enzima con diferente reactividad.

- 6 Se realizaron estudios de protección de la enzima frente a la inactivación por el producto **17**, utilizando SAM, DNC, o ambos; los resultados obtenidos en estos ensayos parecen indicar que los dos grupos que modifica **17** se encuentran situados en el centro activo de la enzima o próximos a él.
- 7 Los estudios de inhibición de COMT realizados con la [2-(3,4-dihidroxi-2-nitrofenil)vinil]-fenil cetona (**21**), muestran que el producto es un inhibidor reversible pero lentamente disociable, "tight-binding".
- 8 Se realizó la síntesis y ensayo de un producto, la [3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-pentanediona (**39**), con una cadena en posición 1 larga y flexible que previsiblemente podría facilitar el acceso del grupo vinilo a los grupos -SH presentes en el centro activo de la enzima. Los ensayos de inhibición de COMT mostraron que se trata de un producto con muy baja afinidad por la enzima, que actúa como inhibidor irreversible de COMT.

## ***BIBLIOGRAFIA***

1. Axelrod J.; Tomchick R. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 702.
2. Molinoff P.B.; Axelrod J. *Ann. Rev. Biochem.* **1971**, 40, 465.
3. Borchardt R.T. *Enzymatic Basis of Detoxication*, **1980**, 2, 43. Editado por Jacoby, Williams. New York:Wiley
4. Axelrod J. *Pharmacol. Rev.* **1966**, 18, 95.
5. MacLagan N.F. y Wilkinson J.H. *Nature*. **1951**, 168, 251.
6. Axelrod J., Senoh S. y Wilkop B. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 697.
7. Guldberg H.G.y Marsden, C.A. *Pharmacol. Rev.* **1975**, 27, 135.
8. Kopin I.J. *Pharmacol. Rev.* **1985**, 37, 335.
9. Bäckström R., Honkanen E., Pippuri A., Kairisalo P., Pystynen J., Heinola K., Nissinen E., Lindén I.B., Männistö P.T., Kaakkola S., Pohto P. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 841.
10. Borgulya J., Bruderer H., Bernauer K., Zürcher G., Da Prada M. *Helv. Chim. Acta.* **1989**, 72, 952.
11. Waldemeier P.C., Baumann P.A., Feldtrauer J.-J., Hauser K., Bittiger H, Bischoff S. y Von Sprecher G. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1990**, 342, 305.
12. Cebardaum J.M., Leger G. y Guttman M. *Clin. Neuropharmacol.* **1991**, 14, 330.
13. Törnwall M. y Männistö P.T. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, 69, 64.
14. Schultz E., Tarpila S.A., Bäckström A.C., Gordín A., Nissinen E. y Pohto P. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1991**, 40, 577.
15. Männistö P.T., Tuomainen P. y Tuominen R.K. *Br. J. Pharm.* **1992**, 105, 569.
16. Piedrafita F.J., Elorriaga C., Fernández-Alvarez E., y Nieto O. *J. Enz. Inhib.* **1990**, 4, 43.

17. Piedrafita F.J., Fernández-Alvarez E, Nieto O. y Tipton K.F. *Biochem. J.* **1992**, 286, 951.
18. Finkle B.J. y Nelson R.F. *Biochim. Biophys. Acta.* **1963**, 78, 747.
19. Borchardt R.T. y Chen C.F. *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 522, 49.
20. Roth J.A. *Biochem. Pharmacol.* **1980**, 29, 3119.
21. Tong J.H., D'Torio A. *Can. J. Biochem.* **1977**, 55, 1108.
22. Nissinen E., Krohnolal U. y Coleman J.R. *Life Sci.* **1988**, 42, 2609.
23. Assicot M. y Bohuon C. *Biochimie*, **1971**, 53, 871.
24. Inscoe J.K., Daly J. y Axelrod J. *Biochem. Pharmacol.* **1965**, 14, 1257.
25. Ball P., Knuppen R. y Breuer H. *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 517.
26. Salminen M., Lundström K., Tilgmann C., Savolaineu N. y Ulmanen I. *Gene*, **1990**, 93, 241.
27. Grossman M.H., Creveling C.R., Rybczynski R., Braverman M., Isersky C. y Breakefield X.O. *J. Neurochem.* **1985**, 44, 421.
28. Roth J.A. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1992**, 120, 1.
29. Jeffery D. y Roth J. *J. Neurochem.* **1984**, 42, 826.
30. Axelrod J. y Vesell E.S. *Mol. Pharmacol.* **1970**, 6, 78.
31. Grossman M.H., Creveling C.R. y Breakefield X.O. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, 158, 776.
32. Malherbe P., Bertocci B., Caspers P., Zürcher G., Da Prada M. *J. Neurochem.* **1992**, 58, 1782.
33. Tilgmann C., Melen K., Lunström K., Jalanko A., Julkunen I., Kalkkinen N. y Ulmanen I. *Eur. J. Biochem.* **1992**, 207, 813.
34. Anderson P.J. y D'Torio A. *Biochem. Pharmacol.* **1968**, 17, 1943.
35. Assicot M. y Bohuon C. *Eur. J. Biochem.* **1970**, 12, 490.
36. Borchardt R.T., Cheng C.-F. y Thakker D.R. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1975**, 63, 69.

37. Gulliver P.A. y Tipton K.F. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *88*, 439.
38. Gulliver P.A. y Tipton K.F. *J. Neurochem.* **1979**, *32*, 1525.
39. Lundström K., Salminen M., Jalauko A., Savolainen R. y Ulmanen I. *DNA and Cell Biol.* **1991**, *10*, 181.
40. Bertocci B., Miggiano V., Da Prada M., Dembic Z., Lahm H.-W y Malherbe P. *Proc. Natl. Acad. Sci..USA* **1991**, *88*, 1416.
41. Kawaia S. *Methods in Biogenic Amine Research*. **1983**. 417. Eds: S. Parvez, T. Nagatsu, I. Nagatsu y H. Parvez. Elsevier Sciences Publishers B.V.
42. Gulliver P.A. y Tipton K.F. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 773.
43. Schultz E., Nissinen E. y Kaakkola S. *Biomed. Chromatogr.* **1989**, *3*, 64.
44. Smit M.P.M., Karmmeyer A. y Westerhof W. *Anal. Biochem.* **1990**, *190*, 268.
45. Guattari B. *J. Chromatogr.* **1991**, *567*, 254.
46. Cornforth J.W., Carrell H.L., Glusker J.P. y Talalay T. *Transmethylation..* **1979**. 19, Eds: Usdin E., Borchardt R.T. y Creveling C.R., Elsevier/North Holland.
47. Garg B., Buckner C., Sethi O., Sokoloski T. y Patil P.N. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1971**, *189*, 281.
48. Gordonsmith R.H., Raxworthy M.J. y Gulliver P.A. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 433.
49. Creveling C.R., Dalgard N., Shimizu H. y Daly J.W. *Mol Pharmacol.* **1970**, *6*, 691.
50. Creveling C.R., Morris N., Shimizu H., Ong H.H. y Daly J.W. *Mol. Pharmacol.*, **1972**, *8*, 398.
51. Masri M.S., Robbins D.J., Emerson O.H. y DeEds F. *Nature*. **1964**, *202*, 878.
52. Flohe L. y Schwabe K.-P. *Biochim. Biophys. Acta.* **1970**, *220*, 469.
53. Coward J.K., Slisz E.P. y Wu F.Y.-H. *Biochemistry.* **1973**, *12*, 2291.
54. Borchardt R.T. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 377.
55. Borchardt R.T. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 382.
56. Rivett A.J. y Roth J.A. *Biochemistry.* **1982**, *21*, 1740.

57. Tunnicliff G. y Ngo T.T. *Int. J. Biochem.* **1983**, 15, 733.
58. Jeffery D. y Roth J.A. *J. Neurochem.* **1985**, 44, 881.
59. Jeffery D. y Roth J.A. *Biochemistry.* **1987**, 26, 2955.
60. Jean L.M. *Science.* **1979**, 203, 737.
61. Männistö P.T. y Kaakkola S. *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**, 10, 54.
62. Männistö P.T. y Kaakkola S. *Pharmacol. Toxicol.* **1990**, 66, 317.
63. Hornykiewicz O. *Movement disorders..* **1982**, 41. Eds: Marsden C.D. y Fahn S. Butterworth Scientific, London.
64. LeWitt P.A. *Drug of the treatment of Parkinson's disease.* **1989**, 325. Eds: D.B.Calne, Springer Verlag.
65. Cotzias G.C., Papavasiliou P.S., Ginos J.Z., Tolosa E.S. *The Nervous System.* **1975**. Vol. 2, 323. Ed. Tower D.B. Raven Press, New York.
66. Da Prada M., Keller H.H., Pieri K., Kettler R. y Haefely W.E. *Experientia.* **1984**, 40, 1165.
67. Fahn S. *Neurology.* **1974**, 24, 431.
68. Gervas J.J., Muradas V., Bazan E., Aguado E.G. y Yebenes J.G. de. *Neurology.* **1983**, 33, 278.
69. Nutt J.G., Woodward W.R., Ganther S.T. y Merrick D. *Ann Neurol.* **1987**, 21, 584.
70. Wade L.A. y Katzman R. *Life Sci.* **1975**. 17, 131.
71. Sandler M., Johnson R.D., Ruthven C.R.J., Reid J.L. y Calne D.B. *Nature.* **1974**, 247, 364.
72. Nutt J.G. y Fellman J.H. *Clin. Neuropharmacol.* **1984**, 7, 35.
73. Cerbadaum J.M. *Clin. Neuropharmacol.* **1989**, 12, 147.
74. Axelrod J. y La Roche M.J. *Science.* **1959**, 130, 800.
75. Bacq Z.M., Grosselin L., Dresse A. y Renson J. *Science.* **1959**, 130, 453.
76. Archer S., Arnold A., Kullnig R.K. y Wylie D.W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, 87, 153.

77. Baldessarini R.J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1972**, 24, 78.
78. Crout J.R., Creveling C.R. y Udenfriend S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1961**, 132, 269.
79. Ross S.B. y Haljasmaa O. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1964**, 21, 215.
80. Bakke O.M. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1970**, 28, 28.
81. Gugler R. y Deugler H.J. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* **1973**, 276, 223.
82. Moffet R.B., Hanze A.R. y Seay P.H. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 178.
83. Reches A., Jiang D. y Fahn S. *Function and Regulation of Monoamine Enzyme: Basic Clin. Aspects, Proc. Conf. 2nd.* **1981**, 683. Eds: Usdin E., Weiner N. y Youdim M.B.H. Macmillan, London.
84. Nuutila J., Kaakkola S. y Männistö P.T. *J. Neural. Transm.* **1987**, 70, 233.
85. Baldessarini R.J. y Creiner E. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 247.
86. Morgan C.D., Ruthven C.R.J. y Sandler M. *Clin. Chim. Acta.* **1969**, 26, 381.
87. Borchardt R.T., Huber J.A. y Houston M. *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 258.
88. Männistö P.T., Kaakkola S., Nissinen E., Lindén I.B. y Pohto P. *Life Sci.* **1988**, 43, 1465.
89. Nissinen E., Lindén I.B., Schultz E., Kaakkola S., Männistö P.K. y Pohto P. *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, 153, 263.
90. Männistö P.T. y Tuomainen P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1991**, 344, 412.
91. Nissinen E., Lindén I.B., Schultz E. y Pohto P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1992**, 346, 262.
92. Matsouka M., Yoshida H. y Imaizumi R. *Biochem. Pharmacol.* **1962**, 11, 1109.
93. Belleau B. y Burba J. *J. Med. Chem.* **1963**, 6, 755.
94. Broch O.J.Jr. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1972**, 31, 217.
95. Borchardt R.T. *J. Med. Chem.* **1973**, 16, 581.
96. Waldmeier P.C., De Herdt P. y Maitre L. *J. Neural. Transm.* **1990**. [Suppl] 32, 381.



97. Briec P.R., Nilsson E. y Antonin K.H. *J. Neural. Transm.* **1990** [Suppl] 32, 387.
98. Borchardt R.T. y Thakker D.R. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, 445, 598.
99. Lutz W.B., Creveling C.R., Daly J.W., Witkop B. y Goldberg L.I. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 795.
100. Elorriaga C., Fernández-Alvarez E., González-Muñoz F., Montuenga C. y Nieto O. *Anal. Quim.* **1976**, 72, 1018.
101. Borchardt R.T. y Thakker D.R. *J. Med. Chem.* **1975**. 18, 152.
102. Schofield. *Aromatic Nitration*. **1980**. Cambridge University Press. Cambridge.
103. Butenandt A. y Scholssberger H.G. *Chem. Ber.* **1952**. 85, 565.
104. Julia M., Manoury P. y Voillaume C. *Bull. Soc. Chim. France.* **1965**. 1417.
105. Velayudhan Nair P. y Robinson R. *J. Chem. Soc.* **1932**. 1236.
106. Pschorr R. y Stöhrer W. *Ber.* **1902**. 35, 4398.
107. Davies. *J. Chem. Soc.* **1923**. 123, 1583.
108. Reid W. y Schiller H. *Ber.* **1952**, 85, 216.
109. Dey B.B. y Kutti V.A. *Proc. Natl. Institut Sci. India.* **1940**. 4, 641.
110. Bhatt M.V. y Kulkarni S.U. *Synthesis.* **1983**. 249.
111. Lee F.G.H., Dickson D.E., Suzuki J., Zirnis A. y Manian A.A. *J. Het. Chem.* **1973**. 10, 649.
112. Fieser L.F. y Fieser M. *Reagents for Organic Syntesis.* **1963**. 1, 30.
113. Kemp D.S. y col. *Tetrahedron.* **1974**. 30, 3677.
114. Bryan P., Murphy. *J. Org. Chem.* **1985**. 50, 5873.
115. Avery M., Verlander M. y Goodman M. *J. Org. Chem.* **1980**. 45, 2750.
116. Mc. Omie J.F.W., Watts M.L. y West D.E. *Tetrahedron*, **1968**, 24, 2289.
117. Williard G. y Bryhle B. *Tetrahedron Lett.* **1980**. 21, 3731.
118. Dixon M. y Webb E.C. *Enzymes* 3ª Edn. **1979**. Longman, London.
119. Palmer T. *Understanding Enzymes.* **1981**. Ellis Horwood.
120. Cornish-Bowden A. y Wharlon C.W. In Focus. *Enzyme Kinetics.* **1988**. IRL Press.

121. Nikodejevic B., Senoh S., Daly J.W. y Creveling C.R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1970**, 143, 83.
122. Zürcher G. y Da Prada M. *J. Neurochem.* **1982**. 38, 191.
123. Nic a'Bháird N., Tipton K.F. *J. Neural. Transm.* **1990**. [Suppl] 32, 359.
124. Lineweaver H. y Burk D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**. 56, 658.
125. Pérez R.A., Fernández-Alvarez E., Nieto O., Piedrafita F.J. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4584.
126. Pinnick H.W. *Organic Reaction.* **1990**. 38, 655.
127. Kitz R. y Wilson I.B. *J. Biol. Chem.* **1962**. 237, 3245.
128. Pérez R.A., Fernández-Alvarez E., Nieto O. y Piedrafita F.J. *Biochem. Pharmacol.* **1993**. 45, 1973.
129. Ray W.J. Jr. y Koshland D.E. Jr. *J. Biol. Chem.* **1961**. 236, 1973.
130. Lluh M. y Friedhoff A.J. *J. Biol. Chem.* **1979**. 254, 299.
131. Williams J.W. y Morrison J.F. *Methods in Enzymology.* **1979**. 63, 437.
132. Easson L.H. y Stedman E. *Proc. R. Soc. London, Ser. B.* **1936**. 121, 142.
133. Goldstein A. *J. Gen. Physiol.* **1944**. 27, 529.
134. Strauss O.H., Goldstein A. *J. Gen. Physiol.* **1943**. 26, 559.
135. Ackermann W.W. y Potter V.R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1949**. 72, 1.
136. Reiner J.M. "Behavior of Enzymes System". **1959**. Burgess, Minneapolis, Minnesota.
137. Morrison J.F. *Biochim. Biophys. Acta.* **1969**. 185, 269.
138. Henderson P.J.F. *Biochem. J.* **1972**. 127, 321.
139. Cha S. *Biochem. Pharmacol.* **1975**. 24, 2177.
140. Schultz E., Nissinen E. *Biochem. Pharmacol.* **1989**. 36, 3953.
141. Johntone R.A.W., Wilby A.H. *Chem. Rev.* **1985**. 85, 129.
142. Zeu E.H., Lesslie T.E. y Bornstein. *Org. Syntheses.* **1976**. 55, 77.
143. Zakharkin L.I., Khalina I.M. *Tetrahedron Lett.* **1962**. 619.
144. Corey E.J. y Schmidt G. *Tetrahedron Lett.* **1979**. 5, 399.

- 145. Trammeli, G.I. *Tetrahedron Lett.*, **1978**. *18*, 1525.
- 146. Fujisawa T., Mori T., Tsuge S. y Sato T. *Tetrahedron Lett.* **1983**. *24*, 1543.
- 147. Olah G.A., Narang S.C., Gupta G.B., Malhotra R. *J. Org. Chem.* **1979**. *44*, 1247.
- 148. Still W.C., Kahn M., Mitra A. *J. Org. Chem.* **1978**. *43*, 2923.
- 149. Perrin D.D., Amarego W.L., Perrin D.R. *Purification of Laboratory Chemicals*. **1983**.  
Pergamon Press. Oxford.
- 150. Goa J. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1953**. *5*, 218.
- 151. Cleland W. *Methods in Enzymology*. **1979**. *63*, 103. Ed. Daniel L. Purich.